



CIAD

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.

**Utilización de biomarcadores para evaluar los efectos  
de Hg y Pb en aves migratorias del noroeste de México**

Por

Sarahi Roos Muñoz

Tesis aprobada por la:

Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Mazatlán, Sinaloa, México

Diciembre 2011

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

---

Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Sarahi Roos Muñoz, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.

---

Dr. Miguel Betancourt Lozano  
Director de Tesis

---

Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza  
Asesor

---

Dra. Olivia Torres Bugarín  
Asesor

---

Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Asesor

---

Dra. Luz María García de la Parra  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, unidad Mazatlán, por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

Al proyecto: Planificación de mecanismos para la conservación legal y restauración de las poblaciones de aves acuáticas migratorias invernales en Marismas Nacionales, Nayarit, México", fase: Evaluación de la contaminación.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT) por la beca otorgada para la terminación de tesis de maestría.

A Dios por darme confianza para emprender este proyecto.

Al Dr. Miguel Betancourt Lozano, por dirigir esta tesis, asesorarme en la elaboración de las presentaciones de los seminarios y acompañarme en los muestreos, por su sencillez y amabilidad.

Al Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza, por su asesoría y revisión de la tesis, por acompañarme en los muestreos y ser tan amable en resolver mis dudas.

A la Dra. Olivia Torres Bugarín, Dra. Silvia Alejandra García Gasca y Dra. Luz María García de la Parra, por ser parte de mi comité de tesis.

Al M. C. Marco Antonio González Bernal, Biol. Paulina Martínez Sarabia, Edgar Cruz Acebedo, Belisario Leyva Morales y Miguel Angel Rodríguez Saldaña por su colaboración en los muestreos.

Al Dr. Rafael Hernández Guzman por la elaboración del mapa de muestreo.

A la M. C. Selene María Abad Rosales por su asesoría en las técnicas para la detección de los centros melanomacrófagos y por facilitar el uso del laboratorio de histopatología.

A la Biol. Rosa María Medina Guerrero por facilitar el uso del laboratorio de parasitología para el conteo de las células sanguíneas y toma de microfotografías de los centros melanomacrófagos.

A las M.C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez y Gabriela Aguilar Zarate por facilitar el uso del laboratorio de ecotoxicología y, al Ing. Carmina Vargas Gomez por su colaboración en la cuantificación de organoclorados.

A la Dra. Jaqueline García Hernández del Laboratorio de Ciencias Ambientales del CIAD Guaymas por la cuantificación de Hg y Pb en las plumas de los organismos muestreados.

Al Lic. Jorge Alberto Durán Niebla por su apoyo en el centro de computación.

A todos mis compañeros de maestría: Jesus Efrén, Tere, Citlali, Alan, Martín, Oscar, Linda, Jari, Elda y Carlos por su amistad y compañía.

Muy especialmente a mi familia, que sin su apoyo no hubiera logrado cumplir con este proyecto: abuelo (papá), mamá, esposo, hijos (Vanesa, Emmanuel y Johanna) y hermano (Gala).

# **Dedicatoria**

**A mi abuelo (papá)**

**A mi esposo**

**A mi madre**

**A mis hijos: Vanesa, Emmanuel y Johanna**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xiii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	xiv
<b>RESUMEN</b>	xvi
<b>I. INTRODUCCION</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. Marismas Nacionales.	4
2.2. Efectos de los contaminantes en aves y en algunos otros organismos.	6
2.3. Efecto de los contaminantes en la condición corporal de las aves y otros organismos.	11
2.3.1. Índice de condición corporal.	11
2.3.1.1. Índice de condición.	11
2.3.1.2. Índices organosomáticos.	12
2.4. Efectos de los contaminantes en el sistema inmune de aves y otros organismos.	13
2.5. Evaluación de genotoxicidad mediante las pruebas de micronúcleos y de células con prolongaciones nucleares.	15
2.6. Migración, alimentación y contaminantes en aves.	18
2.6.1. <i>Anas clypeata</i> .	18
2.6.2. <i>Anas acuta</i> .	20
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	22
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	23
<b>V. OBJETIVOS</b>	24
5.1. Objetivo general.	24

5.2. Objetivos específicos.	24
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	<b>25</b>
6.1. Muestreo de organismos.	25
6.2. Biomarcadores.	30
6.2.1. Índices de condición biológica.	30
6.2.1.1. Índice de condición.	30
6.2.1.2. Índices organosomáticos.	31
6.2.2. Respuesta celular relación heterófilo/linfocito.	31
6.2.3. Respuestas citogenéticas.	32
6.2.4. Metales.	32
6.2.4.1. Cuantificación de Hg total.	33
6.2.4.2. Cuantificación de Pb.	33
6.3. Análisis estadístico.	34
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
7.1. Biomarcadores.	36
7.1.1. Comparación de índices de condición biológica.	36
7.1.2. Respuesta celular-relación heterófilo linfocito.	42
7.1.3. Evaluación de respuestas citogenéticas.	49
7.1.4. Contaminantes.	58
7.1.4.1. Niveles de Hg y Pb en plumas.	58
7.1.4.2. Relación entre el peso corporal y la concentración de contaminantes.	66
7.2. Relación entre biomarcadores.	67
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES</b>	<b>89</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	<b>90</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1: Mapa que representa los lugares y sus respectivas coordenadas del sitio de muestreo.	26
Figura 2: <i>Anas clypeata</i> : (a)Macho, (b)Hembra. <i>Anas acuta</i> : (c)Macho, (d)Hembra.	27
Figura 3. Diagrama de muestreo. Los pasos que se siguieron durante el muestreo se encuentran dentro de los rectángulos, y los biomarcadores considerados durante este estudio están encerrados en círculos.	29
Figura 4: Partes del organismo de donde se tomaron las medidas morfométricas. (a)Cabeza, (b)Culmen, (c)Pico, (d)Tarso, (e)Ala, (f)Cola.	30
Figura 5: Diagrama de cajas y bigotes que indican comparación entre especies ( <i>A. acuta</i> y <i>A. clypeata</i> ) y sexo respecto a (a)IC:índice de condición; (b)IN:índice nefrosmático; (c)IH:Índice hepatosomático; (d)IB:índice bazosomático; H:Hembras; M:Machos; —Mediana y ---Media. Las líneas horizontales que conectan entre grupos significan diferencias significativas.	37
Figura 6: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestran eritrocitos mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	43
Figura 7: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> (b) <i>A. acuta</i> que muestran un linfocito mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	43
Figura 8: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> mostrando un heterófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	44

Figura 9: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestran un eosinófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	45
Figura 10: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestran un basófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	45
Figura 11: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestra un monocito mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).	46
Figura 12: Diagrama de cajas y bigotes que indican la comparación entre especies ( <i>A. acuta</i> y <i>A. clypeata</i> ) y sexo respecto a H/L: relación heterofilo/linfocito; H:Hembras y M:Machos.	48
Figura 13: Frotis sanguíneo de patos de las especies <i>A. clypeata</i> que muestra eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).	50
Figura 14: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestra eritrocitos normocromáticos micronucleados (EMN) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).	50
Figura 15: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestra eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares (BC) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).	51
Figura 16: Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) <i>A. clypeata</i> y (b) <i>A. acuta</i> que muestra eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares (EBC) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).	51
Figura 17: Diagrama de cajas y bigotes que indican comparación entre especies ( <i>A. acuta</i> y <i>A. clypeata</i> ) y sexo respecto a (a)(EPC/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocitos totales; (b)(EPCMN/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; (c)(BC/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos policromáticos; (d)(EMN/10,000 ET):Eritrocitos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; y (e)(EBC/10,000 ET):Eritrocitos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales; H:Hembras; M:Machos; —Mediana y ---Media.	53

Figura 18: Diagrama de cajas y bigotes que indica la comparación entre especies ( <i>A. acuta</i> y <i>A. clypeata</i> ) y sexo respecto a (a)Hg y (b) Pb en plumas; (Hg mg/Kg): Concentración de Hg; (Pb mg/Kg): Concentración de Pb; H:Hembras; M:Machos. —Mediana, ---- Media. Las líneas horizontales que conectan entre grupos significan diferencias significativas.	60
Figura 19: Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales (EPCMN/10,000 ET) y eritrocitos micronucleados normocromáticos/10,000 eritrocitos totales (EMN/10,000 ET) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> .	68
Figura 20: Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (BC/10,000 ET) y eritrocitos normocromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales (EMN/10,000 ET) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> .	69
Figura 21: Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (BC/10,000ET) y eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (EBC/10,000 ET) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> .	70
Figura 22: Relación entre la frecuencia de eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares /10,000 eritrocitos totales (EBC/10,000 ET) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	71
Figura 23: Relación entre la frecuencia de los eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocito totales (EPC/10,000 ET) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	72
Figura 24: Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos /10,000 eritrocitos totales (EPC/10,000 ET) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> .	73
Figura 25: Relación entre el índice de condición (IC) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> , y en (c)Hembras y (d)Machos <i>A. acuta</i> .	74
Figura 26: Relación entre el índice de condición (IC) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	75

Figura 27: Relación entre la relación heterófilo/linfocito (H/L) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos <i>A. acuta</i> .	76
Figura 28: Relación entre el índice nefrosomático (IN) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	78
Figura 29: Relación entre el índice de condición (IC) y el índice nefrosomático (IN) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. clypeata</i> , y en (c)Hembras y (d)Machos <i>A. acuta</i> .	79
Figura 30: Relación entre el índice nefrosomático (IN) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	80
Figura 31: Relación entre el índice hepatosomático (IH) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de <i>A. acuta</i> .	81
Figura 32: Relación entre el índice de condición (IC) y el índice hepatosomático (IH) en (a)Hembras y (b)Machos de la de <i>A. clypeata</i> , y en (c)Hembras y (d)Machos de <i>A. acuta</i> .	82
Figura 33: Relación entre el índice bazosomático (IB) y la concentración de Pb de <i>A. clypeata</i> .	83

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Localidades, fechas y organismos recolectados en Escuinapa, Sinaloa en diciembre 2010 y enero 2011.	26
Tabla 2. Características morfométricas de la especie <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> muestreados en Marismas Nacionales durante diciembre de 2010 y enero de 2011.	35
Tabla 3. Concentración de Hg y Pb en plumas de aves en diversos sitios en el mundo.	65

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
ANEXO I. Caracterización y recuento de células sanguíneas.	111
ANEXO II. Recuento de anomalías nucleares.	111
ANEXO III. Cuantificación de metales.	113
3.1. Cuantificación de Hg total (EPA, 1982; EPA, 1986; Perkin Elmer; 1988).	114
Tabla 1. Cantidad de solución de trabajo para la preparación de estándares.	116
3.2. Cuantificación de Pb (USEPA, 1986).	116
ANEXO IV. Tablas de características morfométricas de <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> .	118
Tabla 2. Características morfométricas de la especie <i>A. clypeata</i> muestreados en Escuinapa, Sinaloa mostrando el promedio y la desviación estándar.	118
Tabla 3. Características morfométricas de la especie <i>A. acuta</i> muestreados en Escuinapa, Sinaloa mostrando el promedio y la desviación estándar.	119
ANEXO V. Tablas de índices de condición corporal de <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> .	120
Tabla 4. Índices de condición corporal de la especie <i>A. clypeata</i> .	120
Tabla 5. Índices de la condición corporal de la especie <i>A. acuta</i> .	121
ANEXO VI. Tablas del de la relación heterófilo/linfocito de <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> .	122
Tabla 6. Relación H/L de la especie <i>A. clypeata</i> .	122
Tabla 7. Relación H/L de la especie <i>A. acuta</i> .	123
ANEXO VII. Tablas de EPC y eritrocitos con anomalías nucleares de la especie <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> .	124
Tabla 8. EPC y eritrocitos con anomalías nucleares de la especie <i>A. clypeata</i> .	124

Tabla 9. EPC y eritrocitos con anormalidades nucleares de la especie <i>A. acuta</i>	125
ANEXO VIII. Tablas de concentraciones de Hg y Pb en plumas de <i>A. clypeata</i> y <i>A. acuta</i> .	126
Tabla 10. Concentraciones de Hg y Pb en plumas de <i>A. clypeata</i> .	126
Tabla 11. Concentraciones de Hg y Pb en plumas de <i>A. acuta</i> .	127

## RESUMEN

Alrededor del mundo, muchos contaminantes son liberados al ambiente. Debido a que las aves se encuentran en los niveles más altos de la cadena alimenticia, acumulan contaminantes de forma biomagnificada, lo cual afecta su fisiología, reproducción o incluso, pueden llegar a la muerte y provocar declines en la población. Tal es el caso de algunas especies de aves como *Anas clypeata* y *Anas acuta* que se establecen en Marismas Nacionales durante la temporada invernal. Para conocer si Hg y Pb afectan la salud de las especies antes mencionadas, se evaluó el índice de condición, los índices organosomáticos, el índice de estrés relación heterófilo/linfocito y el efecto genotóxico mediante el análisis de micronúcleos y prolongaciones nucleares en eritrocitos de sangre periférica, y la cuantificación de las concentraciones de Hg y Pb en plumas. Entre especies y géneros, no hubo diferencias significativas respecto a la concentración de Pb. En *A. clypeata* se encontró que la concentración de Hg es significativamente mayor, sin diferencias significativas entre género. En *A. clypeata* se encontró una correlación significativa entre la concentración de Pb y el índice bazosomático, en machos de *A. acuta*, entre el Hg y el índice de condición, índice nefrosomático e índice hepatosomático. Se podría decir que el Pb provocó disminución del bazo en hembras de *A. clypeata* y, en machos de *A. acuta*, el Hg aumentó el riñón e hígado, y disminuyó el índice de condición. En ambas especies la frecuencia de micronúcleos y prolongaciones nucleares no estuvieron correlacionadas con las concentraciones de Hg o Pb. Por lo anterior se deduce que el Pb podría estar afectando a las hembras de *A. clypeata*, y el Hg a los machos de *A. acuta*.

Palabras clave: Metales, *Anas clypeata*, *Anas acuta*.



## I. INTRODUCCION

Alrededor de todo el mundo muchos contaminantes tales como los compuestos orgánicos persistentes (COPs) y los metales pesados son liberados al ambiente (Jaspers et al., 2006), entendiéndose por COPs aquellos compuestos orgánicos que frecuentemente se encuentran halogenados, dentro de los cuales se encuentran los insecticidas organoclorados y los bifenilos policlorados (BPCs) (Ritter et al., 1995).

Con el aumento de la industrialización a nivel mundial y la demanda de los químicos, la sociedad se enfrenta a graves problemas ecológicos y toxicológicos provenientes de la liberación de contaminantes tóxicos hacia el medio ambiente (Shugart, 1994), particularmente en el siglo XX, miles de trazas de contaminantes orgánicos persistentes se produjeron y liberaron hacia el ambiente (van der Oost et al., 2003). Como consecuencia de esto, ha aumentado la necesidad de un monitoreo ambiental, y existe mayor conciencia pública y comprensión del gobierno respecto a los problemas provocados por los contaminantes como organoclorados desde que se observó durante la década de los 50s y 60s que en los países industrializados, las fallas reproductivas y las altas mortalidades en algunas especies de aves rapaces y acuáticas llevaron al decline a las poblaciones de aves, una vez conocidos los efectos de estos compuestos en el ambiente, el uso de estos contaminantes fue restringido y prohibido por la ley, lo que benefició la recuperación de las poblaciones de aves (Becker, 2003).

En este sentido, la ecotoxicología ha cobrado gran importancia en los últimos tiempos proporcionando información acerca del destino y los efectos de los

tóxicos en el ecosistema mediante el uso de respuestas biológicas (biomarcadores).

Los biomarcadores pueden indicar que los organismos han sido expuestos a estrés (biomarcadores generales), categorías específicas de estrés (natural o relacionada a la exposición del contaminante), o a tipos específicos de estrés (por ejemplo inhibición de la acetilcolinesterasa después de la exposición a ciertos plaguicidas organofosforados, etc.) (Depledge, 1994). Los biomarcadores son muy útiles pues ellos pueden proporcionar una idea del estado de salud de cada organismo (Wayland et al., 2003).

En este sentido las aves acuáticas migratorias han sido propuestas como bioindicadores globales de cambios inducidos por el hombre (Kushlan, 1993), no obstante, son distintas las razones por las que algunas poblaciones de aves han disminuido desde tiempos prehistóricos, algunas de estas son la pérdida del hábitat, la caza, el cambio climático; así como por la exposición a contaminantes (Giesy et al., 2003).

Las aves son un excelente bioindicador de la contaminación y pueden ser usadas para monitorear el nivel de contaminantes ambientales por varias razones como: 1) Son abundantes en número, 2) Algunas tienen un amplio rango de distribución, 3) Se alimentan en diferentes niveles tróficos, y 4) Muchas aves tienen larga vida (Zamani et al., 2009) y en el caso de que se traten de aves migratorias, estas pueden ser usadas para evaluar la exposición a contaminantes en regiones distantes (Rothschild y Duffy, 2005)

Para las aves marinas migratorias, la exposición a los contaminantes está determinada por sus patrones de migración, los cuales algunas veces pueden comprender el hemisferio entero (Braune et al., 2002). Tanto los contaminantes como la exposición a ellos pueden ser modulados por múltiples factores como la calidad del hábitat, los hábitos alimenticios, la disponibilidad del alimento, las estrategias reproductivas, el tiempo de crianza y la localización geográfica durante la migración primaveral o áreas usadas durante el invierno (Kushlan,

1993; Yerkes et al., 2008). Por ejemplo, desde 1971 en aves acuáticas consumidoras de peces de los Grandes Lagos (Canadá) tales como las gaviotas (*Larus spp.*) y el cormorán doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) se les ha estudiado la carga de contaminantes, los resultados muestran una disminución de contaminantes principalmente el DDE (diclorodifenildicloroetileno) y los BPCs (Ryckman et al., 1998), pero también se ha visto que metales como el Hg y el Pb tienden a bioacumularse en las aves (Evers et al., 2005; Tsipoura et al., 2011).

Aunque el uso del DDT en la agricultura ha sido prohibido en gran parte del hemisferio occidental, muchos otros plaguicidas y productos químicos potencialmente tóxicos se siguen usando (Fernandez et al., 2006) en sitios donde muchas aves migratorias pasan el invierno (Braune y Malone, 2006), como es el caso del pato cucharón (*Anas clypeata*) y del pato golondrino (*Anas acuta*) que se distribuyen en América del Norte pero migran para pasar su tiempo de invernación hasta América Central (Austin y Miller, 1995; Dubowy, 1996). Durante su migración arriban a Marismas Nacionales, el cual es considerado el mayor sistema de humedales costeros del Pacífico mexicano (León-Valdez, 2009), área donde la agricultura es una actividad importante.

Debido a factores como la exposición de las de aves a los compuestos antropogénicos (Becker, 2003), la agricultura, la escasez de agua (Austin y Miller, 1995), y el deterioro ambiental (Jordanova et al., 2006), algunas de las poblaciones de aves han disminuido, como es el caso de la especie *A. acuta* (Austin y Miller, 1995) y otras especies de aves (Robertson y Gilchrist, 1998). Con base a lo anterior, es necesario conocer la carga de contaminantes y estudiar los efectos provocados por la acción del hombre en la salud de las aves acuáticas en Marismas Nacionales, tomando como modelo las especies *A. clypeata* y *A. acuta*, y de esta manera poder implementar estrategias que permitan la recuperación de los hábitats que han sufrido degradación ambiental y a los cuales arriban éstas y otras aves migratorias.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Marismas Nacionales

Este bosque de manglar se encuentra a lo largo de las costas de Sinaloa y Nayarit y es considerado como uno de los más grandes en su tipo en la costa occidental de las Américas (Kovacs et al., 2009). En Sinaloa se encuentra ubicado en los municipios de Escuinapa y El Rosario (CONANP, 2008). En este sistema dominan tres especies de manglar: Manglar rojo (*Rhizophora mangle*), manglar negro (*Avicennia germinans*), y manglar blanco (*Laguncularia racemosa*) (Kovacs et al., 2009). El clima es tropical subhúmedo con una temperatura media anual de 27°C y una precipitación total anual de aproximadamente 1000-1500 mm (Kovacs et al., 2004). Este complejo sistema de manglar es una importante área para las aves migratorias y vida silvestre (Flores-Verdugo et al., 1997).

La fauna de Marismas Nacionales en Sinaloa está representada por 380 especies de vertebrados, el grupo de mayor número son las aves con 203 especies principalmente de aves coloniales (garzas); playeras y acuáticas, se estima que 125 especies de aves migratorias utilizan los humedales y los valles para alimentarse, protegerse o anidar, lo que les confiere a estas áreas un alto valor ecológico y de conservación (CONANP, 2008). Por otro lado en los municipios de Huajicori, Acajoneta, Tecuala, Rosamorada, Tuxpan, Ruíz y Santiago Ixcuintla correspondientes al estado de Nayarit se encuentran 291 especies de aves (León-Valdez, 2009).

Los estudios realizados a nivel de paisaje revelan que las actividades humanas han provocado grandes cambios en los componentes acuáticos y terrestres de esta zona (Berlangua-Robles y Ruiz-Luna, 2002), con evidencias de fragmentación y pérdidas de coberturas naturales debido a la deforestación, expansión de zonas urbanas, turísticas, actividades agrícolas, ganaderas y acuícolas (Ramírez-Bojorquez, 2006), en donde la agricultura es una de las actividades más importantes (León-Valdez, 2009), la cual podría estar relacionada con la presencia de plaguicidas dentro del sistema. Entre los pocos estudios en el sistema, Galindo-Reyes et al. (1992) reportaron plaguicidas tales como metoxicloro, DDT, lindano, isodrin, endrin, endosulfan, heptaclor y aldrin en el agua y los sedimentos, con la más alta incidencia de residuos en el comienzo de la estación de lluvias y el ciclo de la agricultura en verano (Galindo-Reyes, 2000).

Estudios realizados por Rodríguez-Preciado (2004) en el tejido de la lisa *Mugil curema* demostraron que los peces provenientes del Estero de Teacapan presentaron concentraciones máximas de Hg de 1.51  $\mu\text{g/g}$ , las cuales son relativamente elevadas, posiblemente por las aportaciones en los ríos que llevan efluentes de la actividad minera y en la cual se utilizó el Hg para la extracción de la Ag y el Au. Asimismo, García-Hernández et al. (2007) encontraron que varias especies de peces provenientes del estero de Teacapán contenían concentraciones de Hg que excedían el límite regulatorio para el consumo humano de 1mg/Kg.

Estudios realizados por Páez-Osuna et al. (2002) demostraron la presencia de Zn e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en ostiones provenientes de la Laguna Teacapán-Agua Brava, en dicha área de estudio, las actividades están enfocadas a la pesca, acuicultura y al área rural, lo que indica la presencia de estos contaminantes en el lugar de estudio, ya que según (Farrington et al., 1983), los ostiones han demostrado ser eficientes acumuladores de elementos traza y cuentan con los requisitos de un indicador biológico

## 2.2. Efectos de los contaminantes en aves y en algunos otros organismos

Las condiciones ambientales no son estáticas, y la influencia del hombre ha acelerado la tasa de deterioro del ambiente, por ejemplo descargando continuamente a los sistemas de agua sustancias químicas (Jordanovva et al., 2006), ya que el hombre al aumentar su interacción con los ecosistemas costeros, crea una amenaza para los ecosistemas acuáticos y terrestres (Landers et al., 2008). Los contaminantes antropogénicos tales como desechos industriales, municipales y agrícolas finalmente terminan en los humedales; por lo que las aves acuáticas son expuestas a variados contaminantes ambientales (Zamani et al., 2009) como organoclorados y metales. La exposición de las aves a los contaminantes durante su estancia en sitios de anidación, o en los sitios donde hacen escala, pueden afectar adversamente sus actividades reproductivas (Kunisue et al., 2003).

Un ejemplo es el adelgazamiento de la cascara de huevos provocado por el DDE, hecho ocurrido en los 60s, lo cual trajo una reducción significativa de aves que se alimentan de peces como águilas calvas y cormoranes de doble cresta (Grasman et al., 1998); las aves son buenas indicadores de estos contaminantes, ya que tienden a biomagnificarse a través de la cadena alimenticia en los tejidos ricos en lípidos (Becker, 2003).

Otros compuestos extremadamente tóxicos para las aves piscívoras son los BPCs, los cuales se producen y liberan al medio ambiente principalmente como resultado de la actividad humana, son persistentes y pueden viajar grandes distancias a través del aire y las corrientes de agua y se bioacumulan en la cadena alimenticia; algunos BPCs son utilizados en transformadores, capacitores, industria del petróleo, adhesivos, plásticos y extensores de plaguicidas; actualmente, los BPCs están distribuidos en el medio ambiente y en la alimentación en cualquier parte del planeta (DiGangi y Petrlik, 2005).

Se conoce que los organoclorados son neurotóxicos (Hamel et al., 2003) y que altas concentraciones de BPCs y DDTs son potenciales alteradores endócrinos y han sido detectados en una variedad de organismos acuáticos (Burger et al., 2007). En aves se ha visto que los xenobióticos pueden interferir con los procesos normales de la diferenciación de órganos reproductivos y el comportamiento del canto, otra implicación que tienen estos alteradores endócrinos, es que pueden provocar discapacidad reproductiva caracterizada por la alta mortalidad de embriones y pollos, crecimiento retardado y deformidades; un ejemplo de esta discapacidad reproductiva es la que se provocó por las dioxinas policloradas/furanos y bifenilos policlorados en aves de los Grandes Lagos (Brunström et al., 2003).

Los organoclorados se acumulan en los organismos debido a una alta afinidad por los lípidos (Braune et al., 2005). El grado de lipoficidad e hidrofiliidad de un compuesto es indicado por el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) (Walker, 2002a), los organoclorados, como por ejemplo el *p,p'*-DDT tienen un  $K_{ow}$  alto lo que quiere decir que tienen más tendencia a moverse hacia los depósitos de grasa y bioacumularse (Walker, 2002a). En agua estos contaminantes tienden a moverse hacia la superficie de la materia orgánica de los sedimentos, donde son retenidos por las fuerzas de van der Waals, esta tendencia de los compuestos hidrofóbicos para vincularse a superficies coloidales tiene dos consecuencias importantes: 1) no son muy móviles, y 2) son frecuentemente muy persistentes por que no son fácilmente disponibles para que los microorganismos los degraden (Walker, 2002b).

Por otro lado, las actividades mineras y de fundición generalmente representan un riesgo para la vida silvestre que habita en las áreas circundantes; estos organismos están expuestos a altos niveles de metales y productos relacionados que pueden causar efectos perjudiciales en la salud de los individuos o de las poblaciones (Baos et al., 2006).

Es evidente que el uso de los metales ha sido fundamental para el progreso de la civilización humana y son intensamente utilizadas por la sociedad moderna,

sin embargo, una vez concentrados los agentes metálicos en la biosfera, generalmente, persisten y no son desintegrados por las fuerzas naturales, de ahí que la persistencia en el medio ambiente en combinación con un uso intensivo por la sociedad moderna a lo largo de los años ha concentrado a los metales en el entorno humano (Waalkes, 2002).

En el pasado, el Hg y sus compuestos se usaban ampliamente en la agricultura, la industria y la medicina (Clarkson, 2002). Actualmente las mayores fuentes de Hg en la atmósfera son las emitidas por el uso de combustibles fósiles (Hylander y Meili, 2003), por lo que este metal se encuentra en altas concentraciones en tejidos de peces carnívoros y de mamíferos marinos en forma de metilmercurio, gracias a la acción de microorganismos presentes en los sedimentos acuáticos que se encargan de biometilar a este metal y de su subsecuente bioacumulación en la cadena alimenticia acuática, provocándose de esta manera, masivos brotes de envenenamiento (Clarkson, 2002).

Este compuesto organometálico es altamente lipofílico y cruza fácilmente la barrera de la sangre (Mela et al., 2007). Está bien establecido que la sangre es el primer mecanismo de transporte para mover el Hg a través del cuerpo, y liberarlo hacia los órganos blanco, donde los efectos toxicológicos pueden ocurrir (Day et al., 2010).

Altas concentraciones de metilmercurio podrían poner en riesgo la salud de las praderas silvestres que son consumidas por organismos acuáticos que habitan estos ecosistemas (Hall et al., 2009) y debido a que las aves obtienen la mayoría del metilmercurio de su dieta (Hall et al., 1997), pueden acumular altos niveles de metilmercurio cuando se alimentan de plantas e invertebrados de humedales con altas tasas de producción de metilmercurio (Hall et al., 2009), por ejemplo, en el 2005 se encontró que las especies de patos *Anas cyanoptera*, y *Bucephala clangula* en el Gran Lago Salado tenían elevadas concentraciones de Hg (Waterfowl Advisories for Mercury, 2005).



En humanos, los principales síntomas observados por la intoxicación con Hg se caracterizan por alteraciones neurológicas que pueden promover la pérdida de la visión y de la audición, ataxia y parestesia (Clarkson et al., 2003).

También se sabe que los compuestos mercuriales causan hemólisis y que podrían acelerar la eritropoiesis (O'Connor y Fromm, 1975) y, en peces se han observado daños en los sistemas olfativo y nervioso (Baatrup, 1991) y alteraciones en los parámetros sanguíneos (Oliveira-Ribeiro et al., 2006).

En aves, el Hg induce el adelgazamiento, la reducción del tamaño del huevo, la deformación de la cáscara, así como la inhibición de la producción de huevos, y la disminución en la sobrevivencia de los polluelos (Lundholm, 1995; Zamani et al., 2009) y tiene efectos embriotóxicos (Heinz y Hoffman, 2003). Las trazas de este metal también están asociadas a efectos perjudiciales, tales como la disminución de la ingesta de alimento lo cual conduce a la pérdida de peso, a la debilidad en las alas combinado con pérdidas de coordinación, dificultades en el vuelo y el caminar, parálisis y convulsiones que pueden causar la muerte del organismo (Scheuhammer, 1987).

Por otra parte, los pellets de Pb provenientes de las armas de fuego son las fuentes de envenenamiento por este metal más común en aves migratorias, mientras otras fuentes menos comunes son las plomadas de pesca, los desechos de minas y los pigmentos de pintura (Friend, 1989). Desde 1874 están documentados registros de mortalidades de aves acuáticas debido a la ingestión de perdigones de Pb, y para 1989 había ocurrido una pérdida anual de 1.6 a 2.4 millones de aves acuáticas debido al envenenamiento por este metal (Sanderson y Bellrose, 1986; Friend, 1989).

Asimismo, la intoxicación por perdigones de Pb ingeridas por otras aves como las palomas (*Zenaida macroura*) es de considerarse, ya que su cacería en los campos puede provocar altas densidades de perdigones, y por lo tanto existe un incremento en el riesgo de exposición de estas aves al Pb (Franson et al., 2009).

Algunos de los efectos provocados por el Pb en palomas y cercetas es la disminución de la supervivencia (Schulz et al., 2006; Guillemain et al., 2007), en aves acuáticas bajo peso y una superficie inferior de la piel desprovista de grasa, así como ausencia o reducida grasa visceral (Friend, 1999). Otros efectos son: anemia, deformación de los eritrocitos (Oliveira-Ribeiro et al., 2006), disminución del peso de los testículos, del número de espermatozoides y de la producción de huevos en aves tratadas con Pb (Kendall y Scanlon, 1981; Edens y Garlich, 1983), y neurotoxicidad (Hoftman et al., 1985; Lidsky y Schneider, 2003).

El Pb es un metal que tiende a formar enlaces covalentes con grupos orgánicos, y tiene la capacidad de combinarse con los grupos sulfidrilos (Walker, 2001), de esta manera pasa a formar parte de las plumas de las aves (Bortolotti, 2010); al respecto, Tsipoura et al. (2011) observaron que la concentración de Pb en plumas del ganso canadiense (*Branta canadensis*) era más alta que la que se encontraba en huevos, músculo e hígado, por lo que estos autores suponen que existe un secuestro exitoso de Pb en este tejido, y según Lucia et al. (2010), la muda parece ser un mecanismo de desintoxicación de este metal.

De igual manera las aves eliminan Hg a través de la excreción, las plumas, y en el caso de las hembras también por medio de los huevos (Braune y Gaskin, 1987a), al respecto, se midió la concentración de Hg en machos y hembras de la gaviota (*Larus philadelphia*), antes y después de la muda y, en las hembras en huevos, resultando que ambos sexos eliminan Hg mediante la muda de las plumas, y las hembras a través de los huevos (Braune y Gaskin, 1987b). De igual manera, estudios realizados en el águila ratonera (*Buteo buteo*) indican que las concentraciones de organoclorados (BPCs y DDT) presentes en plumas, están correlacionadas con las concentraciones que se encuentran en el músculo e hígado (Jaspers et al., 2006).

Se llevó a cabo un estudio con los huevos correspondientes a los años de 1975 a 1998 de tres especies de aves: el fulmar boreal (*Fulmaris glacialis*), la gaviota

tridáctila (*Rissa trydactyla*) y el arao de brunnich (*Uria lomvia*), en ellos se analizó la concentración de organoclorados, encontrándose que los BPCs y el DDT disminuyeron en las tres especies, pero el  $\beta$ -HCH aumentó en *F. glacialis* y *U. lomvia*. Los autores exponen que la reproducción es otra vía más de desintoxicación de los organoclorados, puesto que es un proceso para el cual las hembras necesitan todas las fuentes necesarias para la producción de huevos, y es por medio de los lípidos que ellas depositan los organoclorados en los huevos (Braune et al., 2001). En mamíferos sucede algo similar, dado que los niveles de organoclorados son más altos en machos que en hembras debido a la pérdida de xenobióticos durante el embarazo y la lactancia (Burger et al., 2007). Además los machos y las hembras de cualquier especie pueden estar expuestos a diferentes niveles de contaminantes cuando comen diferentes alimentos, o comen presas de diferentes tamaños (Burger et al., 2007). Por ejemplo, marcadas diferencias fueron encontradas en los niveles de organoclorados entre ballenas de aleta (*Balaenoptera physalus*) machos y hembras del mediterráneo, resultando que los machos contenían más elevadas las concentraciones de organoclorados (Marsili y focardi, 1996). De igual manera, Bastidas-Bonilla (2010) encontró en hígados de machos de la especie del pez dorado (*Coryphaena hippurus*) mayor concentración de organoclorados que en los de hembras.

### 2.3. Efecto de los contaminantes en la condición corporal de las aves y otros organismos

#### 2.3.1. Índices de condición corporal

##### 2.3.1.1. Índice de condición

El índice de condición (IC) es un biomarcador que establece la condición corporal, y se usa para conocer la salud de los individuos (Stevensor y Woods,

2006), ya que la condición corporal indica el estado energético de un organismo; los índices de la condición corporal determinan la masa del individuo asociada con sus reservas energéticas, después de que primero se realizó una corrección con el tamaño corporal (Schulte et al., 2005).

En peces, la condición corporal varía según sea la nutrición, los efectos provocados por los patógenos y por la exposición a los contaminantes tóxicos (Dethloff y Schmitt, 2000). Un ejemplo de esta variación es el incremento del factor de condición en el pez ventosa blanco (*Catostomus commerson*) provocado por una fábrica de papel localizada en Terrace Bay, Ontario (McMaster et al., 1991), contrario a lo sucedido en la garza real (*Ardea albus*) provenientes de los Everglades (Estados Unidos) y alimentadas con Hg, en las cuales, la masa corporal con relación al tamaño fue dos veces menor que la del grupo control (Spalding et al., 2000).

#### 2.3.1.2. Índices organosomáticos

En aves existe granulopoesis en el hígado, el riñón y el bazo (Latimer y Bienzle, 2010), el peso de estos órganos puede proporcionar información general acerca de la maduración y estructura del sistema inmune, y como algunos químicos causan atrofia y/o cambios histológicos en órganos de este sistema, esto frecuentemente se asocia con alteraciones de las funciones inmunes (Grasman, 2002). Por ejemplo los índices nefrosomáticos y hepatosomáticos de algunas gaviotas argénteas (*Larus argentatus*) de los Grandes Lagos fueron menores que los índices presentados en lugares con baja contaminación; por su parte el hígado juega un papel central en procesos de desintoxicación (Fox et al., 2007), su participación en el metabolismo de la mayoría de los materiales orgánicos lo hace vulnerable a las lesiones de los químicos (Reynolds et al., 1985 en Fox et al., 2007).

Por otro lado, las células endoteliales de las nefronas del riñón remueven de la sangre varias sustancias tóxicas y productos de desechos del metabolismo (Goyer, 1985), se ha visto que la masa del riñón es uno de los órganos más sensibles y consistentes indicadores de nefro-toxicidad en mamíferos (Kluwe, 1981).

En el caso del bazo el cual es el principal órgano filtrador de la sangre, en él se llevan a cabo procesos como la fagocitosis, la destrucción de eritrocitos degenerados, aberrantes y parasitados, y la destrucción de algunos patógenos bacterianos y complejos inmunes (John, 1994)

#### 2.4. Efectos de los contaminantes en el sistema inmune de aves y otros organismos

El sistema inmune es una compleja interacción de diferentes tipos de células (e.g. macrófagos, granulocitos, linfocitos) y proteínas solubles circulantes (Fairbrother et al., 1994).

En el caso de los vertebrados, los diferentes componentes del sistema inmune son activados en respuesta a bacterias, virus, hongos e infecciones parasitarias, así como células tumorales (Keller et al., 2005). Estas defensas son vitales para la salud y la supervivencia de los animales, y cuando los mecanismos de defensa son comprometidos por contaminantes ambientales, el organismo puede llegar a ser más vulnerable, debilitarse, enfermarse y hasta ocasionarle la muerte (Weeks et al., 1992 en Keller et al., 2005).

Los contaminantes ambientales también pueden interactuar con varias partes de este complejo sistema, resultando en supresión o en incremento (hipersensibilidad) de las actividades inmunes (Fairbrother et al., 1994) y autoinmunidad (Grasman, 2002). Estos efectos pueden provocar en las aves una reducida habilidad para soportar las severas condiciones invernales o de

anidación (Wayland et al., 2003), a su vez estos estresores ambientales pueden conducir a las aves a la muerte (Korschgen, 1977; Fournier y Hines, 1994).

Uno de los primeros estudios en inmunotoxicología fue realizado por Friend y Trainer (1970), ellos expusieron patos ánades real (*Anas platyrhynchos*) a diferentes concentraciones de BPCs y encontraron que la exposición a estos contaminantes incrementaba la susceptibilidad de estas aves al virus de la hepatitis de pato. Otro estudio fue realizado en gaviones hiperbóreos (*Larus hyperboreus*), aquí se demostró que la presencia de parásitos intestinales estaba asociada con la exposición a organoclorados (Sagerup et al., 2000). Correlaciones negativas han sido encontradas entre las concentraciones de Hg en la sangre y en el recuento celular de linfocitos de caguamas (*Caretta caretta*) (Day et al., 2007). También, se encontró que la exposición de avocetas (*Recurvirostra americana*) a selenio, arsénico, y boro, disminuía la actividad fagocítica realizada por los macrófagos (Fairbrother et al., 1994).

También Rocke y Samuel (1991) exponen que la ingestión de Pb en aves acuáticas aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, ya que muy frecuente se ha observado en estos organismos una elevada concentración de Pb en los tejidos, y una infección de aspergilosis y coccidiosis, además ellos encontraron que en machos de patos ánades real (*A. platyrhynchos*) que ingirieron Pb de manera natural, o por medio de intubación, hubo una significativa reducción de los glóbulos blancos comparado con los controles (Rocke y Samuel, 1991).

Por otro lado, en las aves, los heterófilos y linfocitos son los glóbulos blancos más abundantes (Grasman, 2002), y específicamente en patos, los leucocitos más abundantes son los linfocitos (Fairbrother y O'Loughlin, 1990). La disminución de algún tipo celular puede sugerir una función reducida de las células blancas (Grasman, 2002), por ejemplo, un incremento en la relación heterófilo/linfocito (H/L) ha sido asociada con enfermedades en tortugas verdes (*Chelonia Mydas*) (Aguirre et al., 1995; Work et al., 2001) y como un indicador de estrés que esta positivamente correlacionado con las concentraciones de

mirex y tetraclorodibenzo-*p*-dioxina presente en la grasa de la caguama; esto sugiere que los organoclorados pueden modificar el número de las células inmunes en las tortugas marinas boba (*Caretta caretta*) (Keller et al., 2005). En aves, esta relación puede también variar si los organismos son privados de alimentos (Gross y Siegel, 1986), y por la exposición a contaminantes, por ejemplo, cuando las codornices japonesas (*Coturnix coturnix japónica*) bebieron agua con una concentración de Pb de 100 y 400 ppm presentaron un aumento en el índice H/L (Grasman y Scanlon, 1995).

## 2.5. Evaluación de genotoxicidad mediante las pruebas de micronúcleos y de células con prolongaciones nucleares

Alteraciones en la estructura del ADN frecuentemente ocurren después de la exposición a un agente genotóxico, dichas alteraciones son generalmente corregidas por la maquinaria de reparación del ADN; si tal daño no es corregido o bien, es mal corregido, pueden formarse micronúcleos (MN) (Shugart, 1994), los cuales son fragmentos acéntricos o cromosomas completos que durante el ciclo mitótico (anafase) no lograron unirse al huso mitótico por lo que están excluidos del núcleo (Schmid, 1975; Maluf et al., 2001), estos MN se pueden observar como fragmentos de cromatina que se encuentran fuera del núcleo de las células (Bickham, 1994), algunos mecanismos que pueden estar involucrados en la formación de MN son la rotura del cromosoma y la disrupción del huso (Maluf et al., 2001).

Otras alteraciones nucleares son las prolongaciones nucleares, las cuales son morfológicamente similares a los MN, con la excepción de que ellos si están unidos al núcleo (Rybakovas et al., 2009); algunos investigadores consideran que las prolongaciones nucleares presentes en linfocitos son indicadoras de genotoxicidad (Serrano-García y Montero-Montoya, 2001). Al respecto, Zeljezic y Garaj (2004) mostraron incremento en las frecuencias de MN y de

prolongaciones nucleares en linfocitos humanos expuestos al plaguicida ac. 2,4-diclorofenoxiacético (Zeljezic y Garaj, 2004).

Las células más frecuentemente utilizadas para el análisis de MN son las del sistema hematopoyético, por ejemplo, los linfocitos y los eritrocitos; ya que pueden ser fácilmente obtenidos de la sangre periférica (Tucker y Preston, 1996). La presencia de MN en eritrocitos policromáticos (EPCMN) también es una herramienta muy útil, ya que los eritrocitos policromáticos (EPC) son eritrocitos jóvenes que en aproximadamente 24 h alcanzan su madurez (Schmid, 1975). La observación de EPCMN se debe a la ocurrencia de alteraciones ya sea en el huso mitótico o en los cromosomas debido a causas naturales o a la exposición de genotóxicos (Torres-Bugarín et al., 2007) y según Gómez-Meda et al. (2006), la acumulación de EPCMN está relacionada con la genotoxicidad.

En la sangre periférica de mamíferos, aves, reptiles y anfibios la identificación de MN en eritrocitos de la sangre periférica depende básicamente de la eficiencia del sistema retículo endotelial, el cual es responsable de eliminar los eritrocitos anómalos y/o viejos, a mayor eficiencia de este sistema, menor es la posibilidad de observar eritrocitos micronucleados espontáneos (Zúñiga-González et al., 2000) esto es independientemente de si el organismo está expuesto a agentes genotóxicos o no (Zúñiga-González et al., 2000; Zúñiga-González et al., 2003).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las alteraciones nucleares pueden resultar de exposiciones a químicos y radiaciones ionizantes o no ionizantes (Tucker y Preston, 1996). Estudios realizados en el laboratorio con pollos demostraron que la exposición al plaguicida cimepetrina provocaba altos números de MN en sus células (Sharaf et al., 2010). *In vivo* se llevó a cabo la prueba de MN en tortugas (*Emys orbicularis*) en uno de los estanques de tortugas de la zona industrializada de Sumgayit, República de Azerbaijan en Europa, esta área había sufrido una contaminación generalizada a través del derrame, descarga, escorrentía y dispersión de algunos potenciales



genotóxicos como el Hg (Novillo et al., 2005). Las tortugas de los estanques contaminados mostraron niveles significativamente más altos de 11 químicos en tejidos que las tortugas de los sitios de referencia. Aunque los elevados números de MN en los frotis de sangre de las tortugas de los sitios contaminados no fue estadísticamente diferente de los lugares de referencia, los elevados números de MN en las tortugas procedentes del estanque contaminado fueron estadísticamente correlacionados con los niveles de Hg, heptaclor, diclorifenildicloreto (DDD), hexaclorobenzeno (HCB) y transnonaclor en tejidos (Swartz et al., 2003). También estudios realizados en tres especies de aves acuáticas de la familia Ardeida: la garza impereal (*Ardea purpurea*), la garceta común (*Egretta garzetta*) y la garcilla buellera (*Bubulcus ibis*), pertenecientes a tres sitios de muestreo en España (dos muy contaminados y uno de referencia), mostraron más altos índices de MN en los lugares contaminados comparados con el lugar de referencia (Quirós et al., 2008).

También comparaciones de las frecuencias de MN y prolongaciones nucleares revelaron fuerte correlación en eritrocitos de sangre periférica de carpas (*Carassius auratus auratus*) con el cloruro de mercurio y acetato de plomo; también se observó un incremento en los MN en eritrocitos policromáticos (EPC), y disminución en el porcentaje de EPC (Cavas, 2008). En este mismo estudio el autor sugiere que tanto el cloruro de mercurio como el acetato de plomo además de interferir con la proliferación de eritrocitos, inhiben la liberación de EPC y eritrocitos normocromáticos a la circulación periférica. Por su parte Bonacker et al. (2004) sugiere que la fragmentación del cromosoma (clastogenicidad) y el rompimiento del huso (aneugenicidad) provocada por el Hg inorgánico son mecanismos que conducen a la genotoxicidad cromosomal.

Algunos de los efectos que pueden causar las sustancias genotóxicas son el desarrollo de cáncer, defectos hereditarios a través de mutaciones en células germinales y teratogénesis (Mitchelmore y Chipman, 1998). Estas sustancias genotóxicas raramente dañan solamente al ADN (Klobucar et al., 2003), pues la

mayoría de los productos químicos ejercen sus efectos al mismo tiempo a través de mecanismos genotóxicos y de funcionamiento metabólico (Henderson et al., 2000).

Los genotóxicos pueden interactuar con el ADN blanco del organismo (por mecanismos directos) y no ADN blanco (por mecanismos indirectos) seguido por la aparición de alteraciones citogenéticas y patologías en el organismo (Novillo et al., 2005).

## 2.6. Migración, alimentación y contaminantes en aves

Con frecuencia las aves proporcionan la primera advertencia de los problemas ambientales ya que son fáciles de observar, son objeto de la atención pública, así que los cambios en su biología rara vez son inadvertidos y, debido a que se encuentran en los niveles más altos de la cadena alimenticia, son amenazadas por químicos tóxicos, acumulan compuestos persistentes en altos niveles, lo cual afecta su fisiología, reproducción o, incluso, pueden llegar a la muerte y por lo tanto provocar declines en la población (Becker, 2003), como es el caso de algunas especies de patos como *A. acuta* que habita en la región del Mar de Caspio (Rahbar, 2002 en Rajaei et al., 2010) y el eider común (*Somateria mollissima borealis*) que habita en el área costera de Canadá y Groenlandia (Robertson y Gilchrist, 1998).

### 2.6.1. *Anas clypeata*

Es una especie migratoria perteneciente a la familia Anatidae conocida comúnmente como pato cucharón norteño (Conabio, 2011). Según diversos autores citados por Dubowy (1996) el lugar central de la reproducción de esta especie es Prairie Pothole y otras regiones de Saskatchewan, Alberta,

Manitoba, y el norte de Yukon (Canadá), pero también se reproduce desde el norte de Alaska, Washington, Oregon, Montana, Dakota, Wisconsin y Nuevo Mexico (Estados Unidos). Migra desde finales de agosto y principios de septiembre a las áreas de invernación que van desde el sur de Estados Unidos hasta América Central (Dubowy, 1996), y llega a Sinaloa aproximadamente a mediados de diciembre. Durante su tiempo de invernación habita en humedales de agua dulce, en marismas salinas (Tietje, 1996), en playas y en praderas de arroz (Dubowy, 1996).

Su alimentación está constituida de un 25 % de plantas y un 75 % de animales (Hall et al., 2009) como crustáceos, los cuales los obtiene del agua capturándolos con su pico, que es ideal para atrapar a este tipo de organismos (Dubowy, 1996). Las lamelas que posee a los lados del pico retienen partículas de alimentos durante la filtración (Hill et al., 2010), existen estudios los cuales muestran que por causa de tener tan espaciadas las lamelas la tasa de filtración del agua y el consumo de invertebrados es mejor que la de otros patos (Kooloos et al., 1989). La filtración es el método de forrajeo preferido por esta especie, por lo que mantiene su pico sumergido en el agua más tiempo que otras especies de patos (Dubowy, 1985), y si el agua es poco profunda, frecuentemente remueve con su pico el fango para alimentarse (Dubowy, 1996).

Respecto a la presencia de contaminantes en esta especie, Ohlendorf y Miller (1989) midieron la concentración de plaguicidas organoclorados en organismos provenientes de California, y obtuvieron que sus alas contenían una amplia variedad de plaguicidas, y de todos, el DDE se encontró en mayor cantidad. Según Waterfowl Advisories for Mercury (2005) existen elevadas concentraciones de Hg en estas aves; Ruelas-Inzunza et al. (2009) encontraron en *A. clypeata* que habitaba en las costas de Sinaloa, la presencia de Hg total y orgánico en músculo pectoral; Rothschild y Duffy (2005) encontraron estos mismos contaminantes en los especímenes provenientes del oeste de Alaska pero en músculo, cerebro y hueso, y Parslow et al. (1982) en organismos provenientes de Ouse Washes, Inglaterra encontraron concentraciones de Pb

de hasta 94 mg kg<sup>-1</sup>, las cuales están relacionadas con efectos dañinos a la salud.

### **2.6.2. *Anas acuta***

Es una especie migratoria que pertenece a la familia Anatidae, conocida comúnmente como pato golondrino (Conabio, 2011). Se distribuye abundantemente en Norte América, su principal hábitat de anidación es Alaska y la región Prairie Pothole al sur de Canadá y al norte de las Grandes Planicies; a principios de agosto, llega a las áreas de invernación (Austin y Miller, 1995), como son los estados de California (Miller et al., 2010), Texas (Moon y Haukos, 2009) y Nuevo Mexico en Estados Unidos, y llega a Sinaloa en México (Austin y Miller, 1995) aproximadamente a mediados de diciembre. La migración invernal sucede después de la muda, durante este tiempo, *A. clypeata* permanece frecuentemente en humedales como embalses, marismas, bahías, estuarios y campos agrícolas de arroz, maíz, trigo, soya y pastos (Austin y Miller, 1995). Según Hall et al. (2009), a lo largo de todo el año, su alimentación consiste de un 75 % de plantas y de un 25 % de animales invertebrados acuáticos. Esta especie se alimenta de granos, y semillas de plantas acuáticas, insectos acuáticos, crustáceos y caracoles, además, para alimentarse filtra su alimento mediante su pico (Austin y Miller, 1995) y algunas veces lo sumerge para alcanzar las semillas del fondo (Miller, 1983).

Su hábitat es amenazado por la escasez del agua, el desarrollo de la agricultura, la contaminación, y la urbanización; a lo largo del tiempo, la población de esta especie ha disminuido de seis millones de aves a principios de 1970 a menos de tres millones a finales de 1980 y principios de 1990 (Austin y Miller, 1995), esto se ha reflejado en grandes reducciones en el reclutamiento de individuos de *A. acuta* en importantes regiones de anidación (Proceedings of the Northern Pintail Workshop, 2003). Sin embargo, el reclutamiento podría ser

afectado por las condiciones del hábitat que se encuentran durante la migración invernal y primaveral (Raveling y Heitmeyer, 1989). Los cambios en los paisajes en la escala primaveral podrían eliminar el alimento que soporta la reproducción (Krapu, 1974), de ahí que la conservación de los hábitats en estas áreas es crítica para la viabilidad de las poblaciones a largo plazo (Miller et al., 2010).

Estudios realizados por Ohlendorf y Miller (1989) en plumas de las alas de *A. acuta* provenientes de California, demostraron que la acumulación de plaguicidas organoclorados sucede durante el tiempo de invernación. Algunos otros contaminantes que han sido encontrados en esta especie son dibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y dibenzofuranos (PCDFs) en huevos (Zheng et al., 2007), Hg total e inorgánico en músculo, cerebro y hueso de organismos provenientes del oeste de Alaska (Rothschild y Duffy, 2005), así como mayores cantidades de bismuto en músculo que en hígado, y una correlación positiva entre bismuto y Pb en músculo de especímenes provenientes de la localidad de James Bay Cree en USA (Jayasinghe et al., 2004).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ante la amenaza que presentan las aves migratorias debido a la presencia de contaminantes (algunos de ellos con capacidad de bioacumulación y biomagnificación en la cadena alimenticia), el presente trabajo pretende determinar si Hg y Pb afectan la salud de *Anas clypeata* y *Anas acuta*, especies que invernan en el Noroeste de México, ya que aunque ambas son consideradas omnívoras, lo hacen en porcentajes y hábitos de forrajeo diferentes.

#### IV. HIPÓTESIS

1. Dado que la alimentación del pato cucharón norteno, *Anas clypeata*, se basa en forrajeo de fondo y preferentemente de invertebrados, se espera encontrar mayores concentraciones de metales y, por lo tanto, mayor afectación en respuestas indicadoras del estado de salud en esta especie, que en una especie que se alimenta preferentemente de granos y plantas como es el pato golondrino, *Anas acuta*.
2. Como las hembras de ambas especies se desintoxican a través de la muda y la puesta de huevos, mientras que los machos sólo lo hacen a través de la muda, se espera que las concentraciones de contaminantes sean mayores en machos, con la posible consecuencia en el estado de salud.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar respuestas indicadoras del estado de salud en *Anas clypeata* y *Anas acuta* que invernan en el Noroeste de México en relación a la presencia de Hg y Pb, y hacer una comparación de estas respuestas entre especies y sexos.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Medir respuestas a diferentes niveles de organización biológica (organismo, celular y citogenético).
2. Medir la concentración de Hg total y Pb en plumas.
3. Relacionar en ambas especies la concentración de Hg total y Pb con cada uno de los parámetros estudiados.
4. Comparar las respuestas indicadoras del estado de salud entre machos y hembras de cada especie.



## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Muestreo de organismos

El muestreo se realizó en diferentes sitios en el municipio de Escuinapa, Sinaloa. En la Figura 1 se indican los nombres y la ubicación geográfica de los sitios muestreados en Escuinapa. Este municipio se localiza al sur del estado, junto con el municipio de El Rosario, determina la frontera política de Sinaloa con el estado de Nayarit. Dentro de la agricultura destacan los frutales principalmente de mango, limón, ciruela, aguacate, dátil, cocotero, pero también se cultiva maíz y frijol; este municipio cuenta con plantas dedicadas al empaque y enlatado de frutas y verduras, y con plantas dedicadas al procesamiento, empaque y enlatado de productos marinos; el 55% de su población se dedica a actividades como pesca, agricultura, ganadería y caza, y el 5 % se dedica a la minería (Gob, 2005). Escuinapa es el único municipio del estado que presentó un rápido incremento en su población entre 1980 y 1990 (Aguayo-Hernandez, 1992).

Los muestreos se realizaron durante la temporada de caza de diciembre 2010 y enero 2011 en coordinación con la empresa Aviles Brothers, los cazadores, coordinados por dicha empresa cinegética se encargaban de cazar a los patos mediante el uso de escopetas. Los patos cazados eran recolectados por el personal de la empresa y puestos a nuestra disposición (Tabla 1).

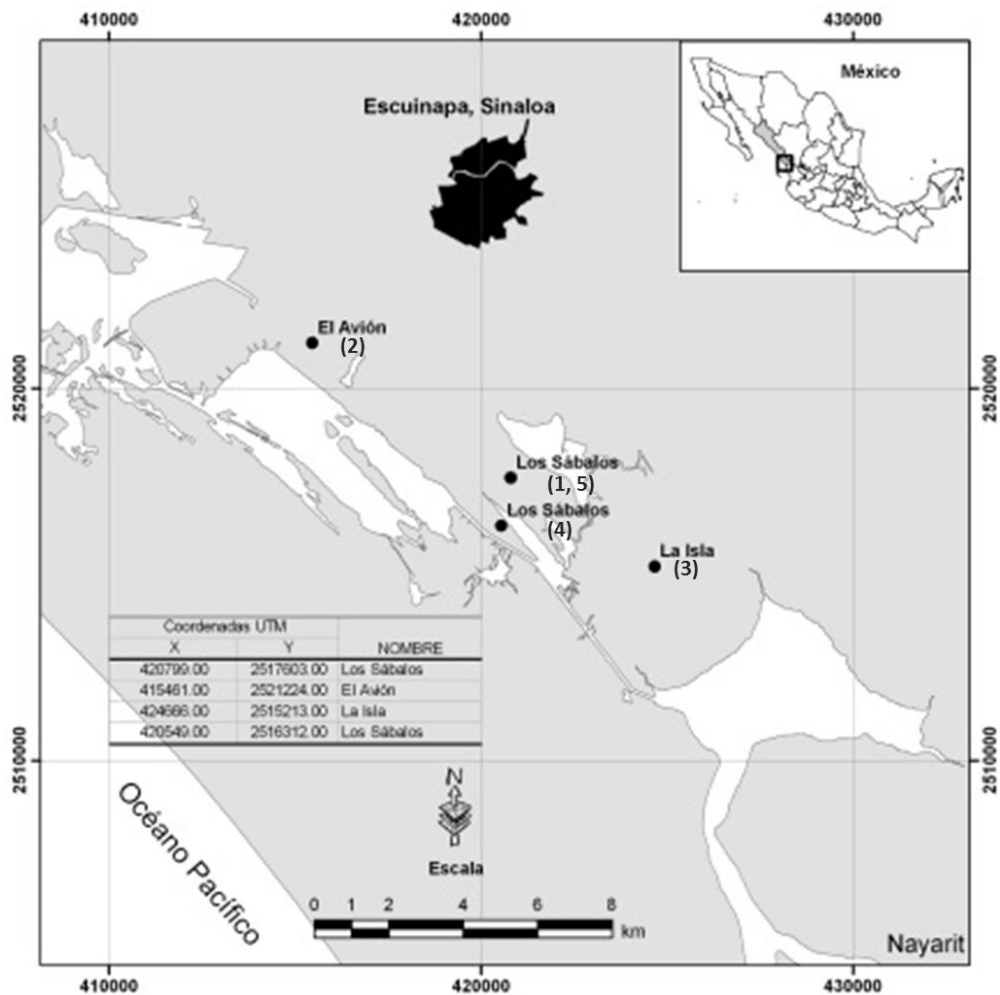


Figura.1. Mapa que representa los lugares y sus respectivas coordenadas del sitio de muestreo.

**Tabla 1. Localidades, fechas y organismos recolectados en Escuinapa, Sinaloa en diciembre 2010 y enero 2011.**

Localidad	Fecha	Organismos recolectados
Los Sábalos 1	15 de diciembre de 2010	3 de <i>A. clypeata</i> 2 de <i>A. acuta</i>
Los Sábalos 2	12 de enero de 2011	2 de <i>A. clypeata</i> 11 <i>A. acuta</i>
El Avi3n 3	19 de enero de 2011	6 de <i>A. clypeata</i> 13 de <i>A. acuta</i>
La Isla 4	27 de enero de 2011	1 de <i>A. acuta</i> 9 de <i>A. clypeata</i>
Los Sábalos 1	28 de enero de 2011	6 de <i>A. clypeata</i>

En total, se tomaron 26 ejemplares de *A. clypeata* (17 hembras y 9 machos) y 27 organismos de *A. acuta* (7 hembras y 20 machos). La identificación de las especies se realizó mediante las características descritas por Dubowy (1996) y Austin y Miller (1995), respectivamente (Figura 2).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2. *Anas clypeata*: (a)Macho, (b)Hembra. *Anas acuta*: (c)Macho, (d)Hembra.

La especie *A. clypeata* se distingue de otras por su pico ensanchado y espatulado, con lamelas en forma de peine a lo largo del borde lateral, es una especie que presenta dimorfismo sexual, el plumaje de los machos tiene una mancha de color azul brillante en la parte anterior de las alas y con una marcada franja de color blanco en el borde. Todas las plumas del macho presentan una iridiscencia de color amarillo brillante; en las hembras también se encuentra una mancha en la parte anterior de las alas pero de color azul opaco y sin la presencia de la franja de color blanco en el borde, todas las plumas de las hembras presentan una iridiscencia de color café amarillento. La especie *A. acuta* se distingue de otras especies por su cuello largo, estrecho y cola puntiaguda; en esta especie existe también el dimorfismo sexual. El plumaje de los machos es de color café oscuro en la cabeza, y de color blanco en el cuello y partes inferiores; las hembras se caracterizan por poseer manchas de color café en las alas y un pico con manchas que van desde el color gris oscuro al color negro.

En la Figura 3 se muestra la secuencia que se siguió durante el muestreo. Con la finalidad de establecer el estado de salud de los organismos, de cada ejemplar se tomaron muestras de sangre de la vena yugular y se realizaron seis frotis sanguíneos para determinar la relación H/L y las respuestas citogenéticas en eritrocitos. También de cada organismo se obtuvo el índice de condición, para lo cual se tomaron medidas morfométricas de la cabeza, el culmen, el tarso, el ala y la cola; el peso total y sin vísceras. Posteriormente para poder analizar la concentración de Hg y Pb se sustrajeron plumas del pecho. Y para los índices somáticos (hepatosomático, nefrosomático y bazosomático) se pesaron los órganos involucrados, y se pesó el organismo completo y sin vísceras. Durante el muestreo, las plumas fueron conservados en hielo, y al llegar al laboratorio fueron refrigerados a -20°C hasta su posterior análisis. La descripción metodológica de los análisis se indica a continuación.

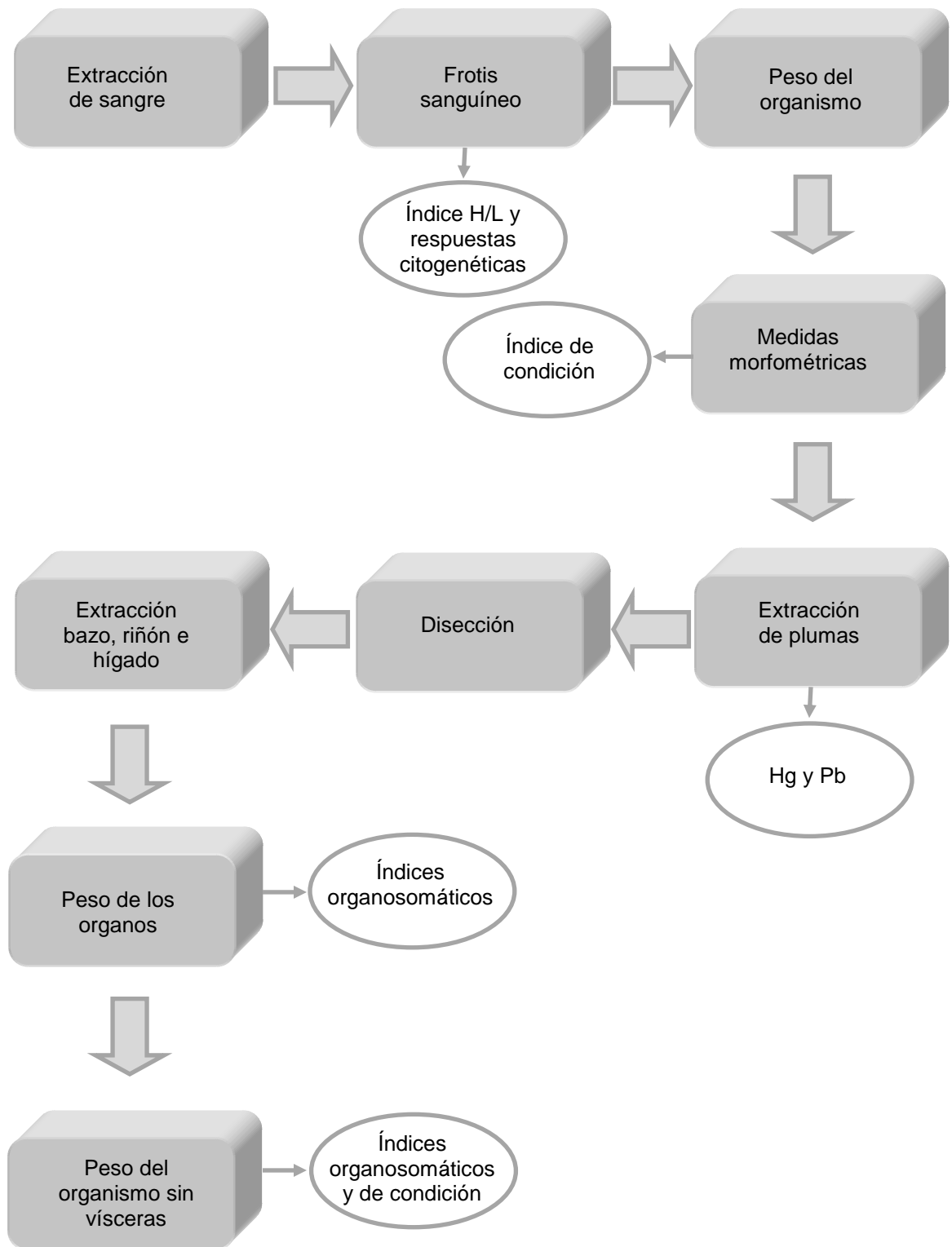


Figura 3. Diagrama de muestreo. Los pasos que se siguieron durante el muestreo se encuentran dentro de los rectángulos, y los biomarcadores considerados durante este estudio están encerrados en círculos.

## 6.2. Biomarcadores

### 6.2.1. Índices de condición biológica

#### 6.2.1.1. Índice de condición.

Los organismos completos y sin vísceras fueron pesados en una balanza digital marca Berkley FS50, con una capacidad de 22.7 Kg y una precisión de 0.01 Kg. Las mediciones morfométricas fueron tomadas con un vernier marca Mitutoyo, con un rango de 150 mm y un error instrumental de  $\pm 0.2$  como se muestra en la Figura 4.

Con las medidas obtenidas se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Schulte et al., 2005) mediante Statistica 7, de donde a partir de las diferentes medidas morfométricas se eligió un valor que representaba el mayor porcentaje de la variabilidad, el cual fue graficado con el peso sin vísceras para obtener el valor esperado, este último valor fue restado al peso eviscerado y el dato que se obtuvo fue dividido entre el valor esperado.

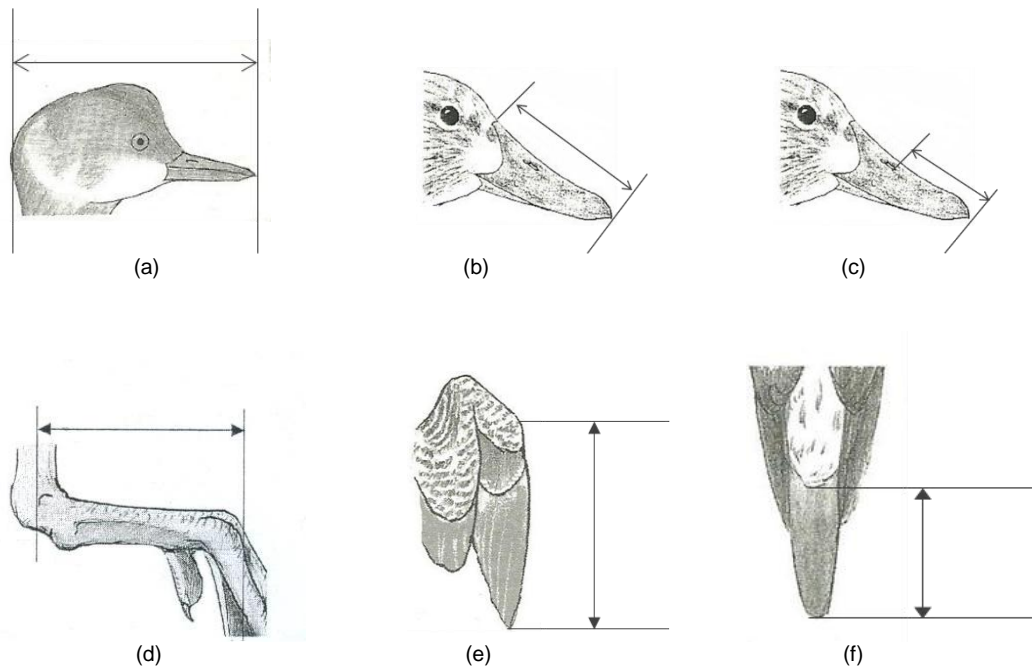


Figura 4. Partes del organismo de donde se tomaron las medidas morfométricas. (a)Cabeza, (b)Culmen, (c)Pico, (d)Tarso, (e)Ala, (f)Cola (Pyle, 2008).

#### 6.2.1.2. Índices organosomáticos.

El peso sin vísceras del organismo y el peso del hígado, del riñón y del bazo se incluyeron en la siguiente fórmula para conocer los índices organosomáticos:

$$\text{OSI} = \frac{\text{Masa del órgano} \times 100}{\text{Masa del cuerpo}} \text{ (Truman et al., 2010)}$$

OSI = Índice organosomático

Los órganos se pesaron en una balanza analítica (Explorer OHAUS, modelo E1D110, con una capacidad máxima de 4,100 g y una precisión de 0.1 g).

#### **6.2.2. Respuesta celular-relación heterófilo/linfocito**

Para la relación H/L a cada organismo se le extrajo sangre de la vena yugular con una jeringa de tuberculina (Terumo) de 1 cc/ml con jeringa de 25G x 16 mm y aguja de 25G x 5/8". Una vez extraída la sangre, se quitó la aguja de la jeringa y se colocó una gota de sangre en tres portaobjetos. Durante el muestreo se procedió a realizar los frotis y se dejó secar la sangre al aire libre, una vez secos, los portaobjetos fueron guardados en una caja para laminillas y en el laboratorio se fijaron los frotis con metanol.

La tinción de los frotis se realizó con Wright-Giemsa mediante el protocolo propuesto por Del Río-Zaragoza et al. (2008). Todas las células sanguíneas fueron caracterizadas mediante el objetivo 100x en un microscopio (OLYMPUS, modelo BX51) y las imágenes fueron capturadas con una cámara (OLYMPUS, modelo C-5050 zoom). Se contaron al menos 200 células para obtener el recuento diferencial de leucocitos y obtener la relación heterófilo/linfocito (ANEXO I).

### **6.2.3. Respuestas citogenéticas**

Para el análisis de MN y prolongaciones nucleares en eritrocitos se procedió de la misma manera que para obtener la relación H/L, solo que la fijación de las laminillas en metanol fue durante 10 min.

Luego se procedió acorde a la metodología propuesta por Zamora-Perez et al. (2004). Después de fijar las laminillas con metanol, se dejó evaporar al aire libre y se procedió a teñir con naranja de acridina, esta tinción identifica claramente los MN que se tiñen de verde amarillento al igual que el núcleo, también reconoce a los EPC, los cuales se tiñen de un color rojo fluorescente, y a los eritrocitos normocromáticos, los cuales se tiñen de un color verde opaco (Hayashi et al., 1983). Posteriormente, se colocó una gota de buffer de fosfato sobre la muestra, se tapó con un cubre objetos y se procedió a realizar el recuento de las células con el objetivo de 100x de un microscopio de fluorescencia marca ZEISS, modelo Axiostar plus y se tomaron microfotografías de las células con la cámara marca ZEISS AxioCam, modelo ICc 1. Para el recuento se consideraron 10,000 eritrocitos por lámina.

Dentro de las anormalidades nucleares se consideró como MN, a pequeños cuerpos citoplasmáticos en forma redonda u ovoide, con el mismo plano óptico que el núcleo principal y que además, no estuviera conectado a él (Bolognesi et al., 2006), y como prolongaciones nucleares se consideró a los eritrocitos con núcleos que presentaban protuberancias en la membrana nuclear (Carrasco et al., 1990 en Cavas, 2008) (ver ANEXO II).

### **6.2.4. Metales**

Para la determinación de Hg total y Pb en plumas, éstas una vez extraídas del pecho de las aves fueron guardadas en bolsas y luego en hielo. Las bolsas



fueron previamente enjuagadas con ácido nítrico al 20 % y después con agua destilada.

La determinación de metales en plumas fue realizada en colaboración con la Dra. Jaqueline García Hernández del Laboratorio de Ciencias Ambientales del CIAD Guaymas. Tanto el Hg total como el Pb se midieron por espectrofotometría de absorción atómica mediante el equipo Perkin Elmer Modelo 1100 B. Las plumas se lavaron (Furness et al., 1986) y digirieron (EPA, 1996; CEM Corp, 2001a; CEM Corp, 2001b) antes de la lectura de Hg y Pb.

#### 6.2.4.1. Cuantificación de Hg total

La cuantificación de Hg total (EPA, 1982; EPA, 1986; Perkin Elmer, 1988). se llevó a cabo con el accesorio generador de hidruros, el límite de detección para la determinación de este metal fue 0.001 mg/Kg, el procedimiento de absorción atómica para la determinación de Hg total se basó en la absorción de la radiación a 253.7 nm por vapor de Hg.

#### 6.2.4.2. Cuantificación de Pb

La cuantificación de Pb (USEPA, 1986), se llevó a cabo con el accesorio horno de grafito, el límite de detección para la determinación de este metal fue 0.01 mg/Kg, el procedimiento de absorción atómica para la cuantificación de Pb se basó en la absorción de la radiación a 283.3 nm (ANEXO III).

### 6.3. Análisis estadístico

Para determinar si los datos presentaban una distribución normal se usó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Para identificar si existían diferencias significativas en los índices de condición biológica, en la relación H/L, en las anormalidades nucleares y en las concentraciones de Hg y Pb entre especies se usó la prueba Kruskal-Wallis (si los datos no se distribuían normalmente) acoplada con el método de Dunn, o ANDEVA de una vía (si los datos tenían una distribución normal) acoplada con la prueba de Holm-Sidak. Lo mismo se aplicó para comparar machos y hembras de una misma especie. Para conocer si los biomarcadores estaban correlacionados unos con otros, se usó la prueba de Correlación de Pearson. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de significancia del 0.05%. Los análisis se llevaron a cabo con el programa SigmaPlot (v 11.0).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de los organismos muestreados en Marismas Nacionales así como sus medidas morfométricas promedio se muestran en la Tabla 2, separados por especie y por sexo. En el ANEXO IV se muestran los datos por individuo.

**Tabla 2. Características morfométricas de la especie *A. clypeata* y *A. acuta* muestreados en Marismas Nacionales durante diciembre de 2010 y enero de 2011.**

	n	lca (mm)	lcu (mm)	lp (mm)	lt (mm)	la (mm)	lco (mm)	W (Kg)
<b><i>A. clypeata</i></b>								
<b>Hembras</b>	17							
<b>Promedio</b>		111.03	59.82	43.83	44.09	231.00	72.71	0.35
<b>(DS)</b>		3.92	3.02	1.52	3.10	5.15	4.92	0.04
<b>Machos</b>	9							
<b>Promedio</b>		108.99	63.53	46.66	44.82	245.44	76.22	0.40
<b>(DS)</b>		12.46	4.99	1.08	3.14	7.04	6.42	0.07
<b><i>A. acuta</i></b>								
<b>Hembras</b>	7							
<b>Promedio</b>		104.00	47.99	34.56	51.31	261.43	104.43	0.62
<b>(DS)</b>		3.01	3.75	2.46	2.62	7.48	6.02	0.10
<b>Hembras</b>	20							
<b>Promedio</b>		110.47	51.18	39.14	53.65	279.95	162.85	0.80
<b>(DS)</b>		3.949	4.188	1.597	3.387	8.387	30.969	0.098

lca:Longitud de cabeza; Lcu:Longitud de culmen; lp:Longitud de pico; lt:Longitud de tarso; la:Longitud de ala; lco:Longitud de cola; W:Peso sin vísceras; DS:Desviación estándar.

## 7.1. Biomarcadores

### 7.1.1. Comparación de los índices de condición biológica

El **índice de condición (IC)** es la relación de la masa con el tamaño del cuerpo; una gran masa con relación al tamaño del cuerpo significa una buena condición corporal (Chappell et al., 2011), la condición corporal es un biomarcador que se usa para conocer la salud de los individuos (Stevenson y Woods, 2006), ya que habla de su estado energético (Schulte et al., 2005).

Los resultados del IC no indicaron diferencias significativas entre *A. clypeata* y *A. acuta* ( $F=0.481$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.697$ ) (Figura 5a). El promedio del IC que se encontró para *A. clypeata* fue 0.0005, con valor máximo y mínimo de 0.193 y -0.191, respectivamente, y en *A. acuta* el promedio del IC es -0.0002, con valor máximo y mínimo de 0.301 y -0.213, respectivamente (ANEXO V). El IC promedio que se encontró en hembras de *A. clypeata* fue 0.0068 y en machos fue -0.0115. Para *A. acuta*, el IC que se encontró en las hembras y machos fue -0.0002 y 0.0162 mg/Kg, respectivamente. En ambas especies no hubo diferencias significativas respecto al sexo ( $P=0.697$  y  $P=0.697$  para *A. clypeata* y *A. acuta*, respectivamente).

Los resultados aquí presentados contrastan con otros estudios donde sí se encontraron diferencias respecto a IC. Por ejemplo, Chappell et al. (2011) observaron diferencias significativas en el IC entre sexos en la especie del tilonorrinco de Nueva Guinea (*Ptilonorhynchus violaceus*), ya que los machos capturados en Nueva Gales, Australia, desde el 2001-2003 tuvieron significativamente menores IC que las hembras; sin embargo, con el paso de los años, la condición disminuyó en ambos sexos. La disminución del IC a través del tiempo en ambos sexos podría ser debida a la carencia de alimento o bien a algún otro factor ambiental, como la exposición a patógenos o a contaminantes. En ese estudio, esto pudiera deberse a que el tamaño de

muestra fue mayor (52 machos adultos y 28 hembras adultos) que en el presente estudio (17 hembras y 9 machos de *A. clypeata* y 7 hembras y 20 machos de *A. acuta*).

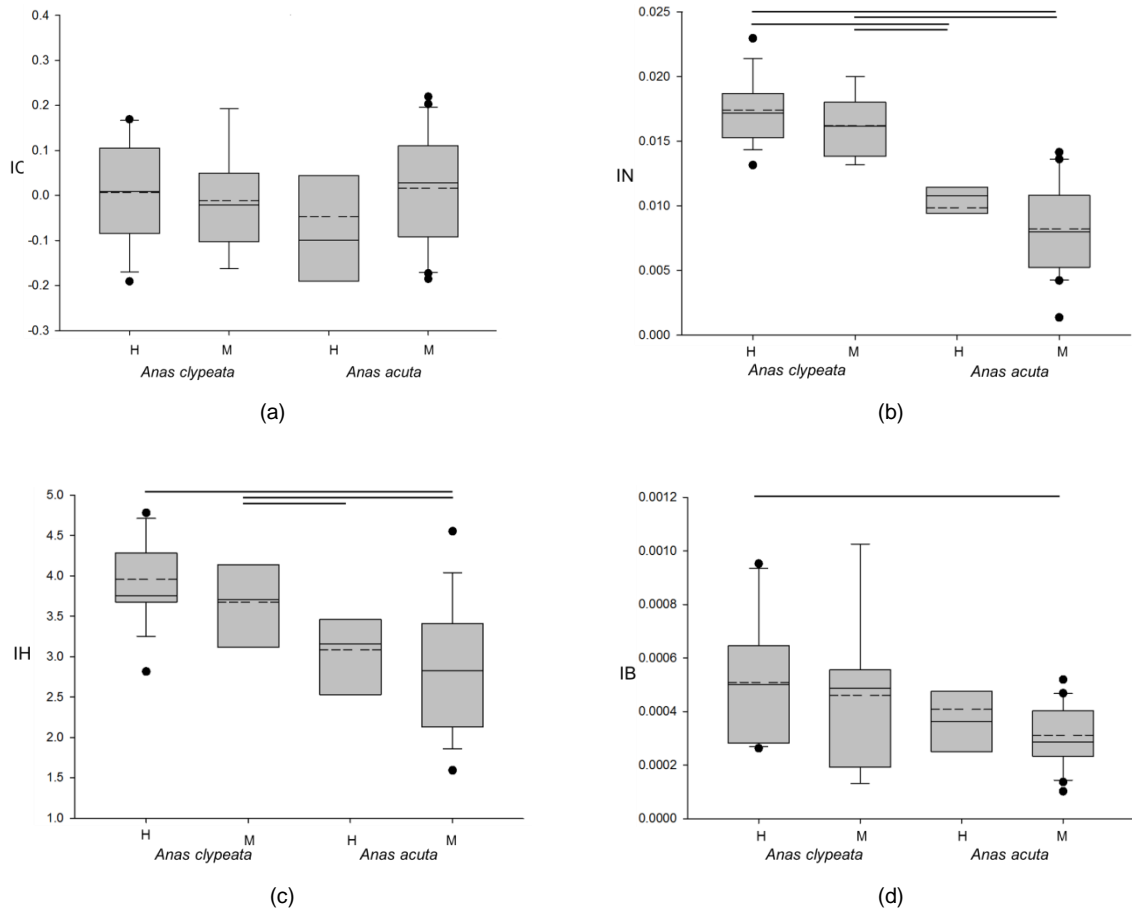


Figura 5. Diagrama de cajas y bigotes que indican comparación entre especies (*A. acuta* y *A. clypeata*) y sexo respecto a (a) IC: índice de condición; (b) IN: índice nefrosomático; (c) IH: Índice hepatosomático; (d) IB: índice bazosomático; H: Hembras; M: Machos; — Mediana y ---- Media. Las líneas horizontales que conectan entre grupos significan diferencias significativas.

En el presente estudio se observó una variación en los IC estimados para ambas especies, y fueron las hembras de *A. acuta* las que presentaron el menor IC. Un animal con una buena condición tiene mayores reservas energéticas que un animal con una pobre condición (Schulte et al., 2005), por lo que los animales con más grandes reservas energéticas pueden tener mayor resistencia al ayuno y más alta supervivencia que los individuos con menores reservas energéticas (Millar y Hickling, 1990). El hecho de observarse animales

con menores IC podría indicar que hay carencias en la disponibilidad del alimento en la ruta de migración o que los organismos estuvieron expuestos a algún patógeno o contaminante ambiental, o bien es una condición normal debido al gasto energético durante la migración (Dethloff y Schmitt, 2000).

Los resultados del **índice nefrosomático (IN)** indican diferencias estadísticamente significativas entre *A. clypeata* y *A. acuta* ( $F=37.152$ ,  $gl=3$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 5b). El promedio que se registró en *A. clypeata* fue de 0.017, con valor máximo y mínimo de 0.023 y 0.013, respectivamente, y en *A. acuta* el IN promedio fue de 0.009, con valor máximo y mínimo de 0.014 y 0.001, respectivamente (ANEXO V). El valor promedio del IN en hembras de *A. clypeata* fue de 0.017 y en machos fue de 0.016. Para *A. acuta*, el IN que se encontró en hembras y machos fue de 0.01 y 0.008, respectivamente. En ambas especies no se encontraron diferencias significativas respecto al sexo ( $P=0.325$  y  $P=0.203$  para *A. clypeata* y *A. acuta*, respectivamente). Las células endoteliales de las nefronas del riñón remueven de la sangre varias sustancias tóxicas y productos de desecho del metabolismo (Goyer, 1985).

Warui (1989) realizó un estudio comparativo entre índices de condición biológica de 61 aves, en total fueron 14 especies y 6 órdenes. Encontró que las aves paseriformes (por ejemplo *Poephilia gutata*, *Lonchura punctulata* y *Passer domesticus*) presentaban riñones significativamente más grandes por masa corporal que las aves no paseriformes (por ejemplo, *Meleagris gallopavo*, *Anas platyrhynchos* y *Streptopelia decaocto*). Asimismo, encontró riñones significativamente menores por masa corporal en aves galliformes (por ejemplo *Meleagris gallopavo*, *Gallus domesticus* y *Numida meleagris*) respecto a aves no galliformes (por ejemplo *Anas platyrhynchos*, *Streptopelia decaocto*, y *Melopsittacus undulatus*). También encontró que las pequeñas aves (por ejemplo, *Coturnix coturnix*, *Streptopelia decaocto* y *Melopsittacus undulatus*) presentaban riñones significativamente más grandes por masa corporal que las grandes aves (todas las demás aves). Además observó que entre los riñones de las aves del desierto (*Melopsittacus undulatus* y *Amadina fasciata*) y de las

que no son del desierto (todas las demás aves) no existían diferencias significativas por masa corporal. Por último encontró que las aves acuáticas (*Anas platyrhynchos* y *Podiceps cristatus*) tenían riñones significativamente menores por volumen corporal que las aves no acuáticas (todas las demás aves). Con todo lo anterior, Warui (1989) sugiere que las diferencias encontradas entre el volumen del riñón por gramo de masa corporal puede ser influenciado por el orden taxonómico al que pertenecen las aves, al tamaño del cuerpo y el hábitat, aunque sólo se enfocó a las comparaciones entre órdenes de aves, sin hacer diferenciación entre sexos y únicamente utilizó a la especie *A. platyrhynchos* dentro del orden de los Anseriformes.

El hígado juega un papel importante en los procesos de desintoxicación (Fox et al., 2007), su participación en el metabolismo de la mayoría de los materiales orgánicos lo hace vulnerable a las lesiones de los químicos (Reynolds et al., 1985 en Fox et al., 2007).

Los resultados del **índice hepatosomático (IH)** indican diferencias significativas entre *A. clypeata* y *A. acuta* ( $F=10.109$ ,  $gl=3$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 5c). En *A. clypeata* el promedio del IH fue de 3.858, con valor máximo y mínimo de 4.781 y 2.816, respectivamente, y en *A. acuta* el promedio del IH fue de 2.898, con valor máximo y mínimo de 4.554 y 1.592, respectivamente (ANEXO V). El IH promedio que se encontró en hembras de *A. clypeata* fue de 3.956 y en machos fue de 3.674; para *A. acuta*, el promedio del IH que se encontró en hembras y machos fue de 3.084 y 2.825, respectivamente. En ambas especies no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al sexo ( $P=0.307$  y  $P=0.356$  para *A. clypeata* y *A. acuta*, respectivamente). Tanto en el IN como en el IH los machos presentaron menores valores respecto a las hembras, aunque en ninguno de los casos las diferencias fueron significativas.

Mora et al. (2006) recolectaron durante el año 1999 y 2000 golondrinas de la especie *Petrochelidon fulva* y *P. pyrrhonota* en ocho localidades ubicadas a lo largo del Río Grande, desde Brownsville hasta El Paso Texas en USA (lugares con alta contaminación ambiental), y también de un lugar de referencia cerca de

Somerville. A estas especies se les midió la masa corporal, el IH, el IB, la concentración de organoclorados y de metales como Cd, Cu, Hg, Mn, V, Se, Al, Cr, Ni, Pb y Zn. Los organismos provenientes de El Paso presentaron significativamente mayores concentraciones de DDE, Cd, Cu, Hg, Mg, V y Se, y concentraciones elevadas aunque no de forma significativa de Al, Cr, Ni, Pb y Zn. El IH en las hembras de *P. fulva*, provenientes de Brownsville, Laredo y de Llano Grande, fue significativamente mayor que en machos. En *P. pyrrhonota* el IH fue también significativamente mayor en hembras que en machos provenientes de Brownsville y Falcon Lake. Quizá los contaminantes provocaron un aumento en el IH de los organismos, ya que los autores encontraron una correlación significativa entre este biomarcador y la concentración de contaminantes ambientales presente en los organismos. Los resultados de Mora et al. (2006) coinciden con el presente trabajo, ya que las hembras de *A. clypeata* y *A. acuta* poseen mayores IH y concentraciones de Pb en plumas que los machos, aunque no de forma significativa (Ver Figura 18b). Una vez que el organismo ingirió el Pb, este se traslada a la circulación sanguínea y, es en el hígado uno de los órganos en donde se deposita este metal (Patte y Pain, 2002) y, también se encarga de sintetizar metalotioneínas para la desintoxicación de metales (Smet et al., 2001). Debido a las actividades de desintoxicación de los contaminantes en el hígado, es que sucede un aumento en el IH (Pereira et al., 1993 en Kopecka-Pilarczyk y Correira, 2009). El Pb por su parte afecta diversos parámetros hematológicos, al cerebro y a la supervivencia del organismo (Pattee y Pain, 2002).

Entre *A. clypeata* y *A. acuta*, los resultados del **índice bazosomático (IB)** indican diferencias significativas ( $H=8.077$ ,  $gl=3$ ,  $P<0.044$ ) (Figura 5d). El promedio del IB que se encontró en *A. clypeata* fue de 0.0005, con valor máximo y mínimo de 0.001 y 0.0001, respectivamente, y en *A. acuta*, el promedio del IB fue de 0.000337, con valor máximo y mínimo de 0.0009 y 0.0001, respectivamente (ANEXO V). El promedio del IB en hembras de *A. clypeata* fue de 0.0006 y en machos de 0.0005. Para *A. acuta*, el promedio del



IB en hembras y machos fue de 0.0004 y 0.0003, respectivamente. En ambas especies no se encontraron diferencias significativas respecto al sexo ( $P>0.05$ ).

El bazo es el principal órgano filtrador de la sangre, en este órgano se llevan a cabo procesos como la fagocitosis, la destrucción de eritrocitos degenerados, aberrantes y parasitados, y la destrucción de algunos patógenos bacterianos y complejos inmunes, por lo que el aumento de este órgano puede ser provocado por la presencia de células anormales, parásitos o toxinas en la sangre (John, 1994).

Respecto al estudio realizado por Mora et al. (2006), estos autores también encontraron que en *P. pyrrhonota* y *P. fulva*, la masa del bazo fue mayor en El Paso (uno de los lugares con mayores concentraciones de organoclorados) que las otras localidades. También observaron una correlación significativa entre la masa del bazo y la concentración de contaminantes ambientales presentes en los organismos, y mencionan que la masa del bazo fue el índice que mejor indicó el efecto de la exposición a los contaminantes, ya que estuvo correlacionado negativamente con la masa corporal. En el presente estudio, a pesar de que ambos sexos de *A. clypeata* mostraron significativamente mayores concentraciones de Hg que *A. acuta*, sólo las hembras presentaron un IB significativamente.

Se observa que *A. clypeata* tuvo significativamente mayores IH, IB e IN, quizá debido al estado nutricional, a efectos de los patógenos y/o contaminantes ambientales, o bien a los diferentes hábitos alimenticios. Xuan (2004) expone que las diferencias encontradas en el IN, el IH y el IB además de deberse a las interacciones de los organismos con los diferentes compuestos químicos ambientales, la condición corporal también podría influir. Además, Warui (1989) sugiere que las diferencias encontradas entre el volumen del riñón por gramo de peso corporal puede ser influenciado por el tamaño del cuerpo, esto coincide con los mayores valores del IC que se observaron en *A. clypeata* (aunque no de forma significativa), en cuya especie se encontraron significativamente mayores IN.

### 7.1.2. Respuesta celular-relación heterófilo/linfocito

Para poder obtener la relación heterófilo/linfocito primero se tuvo que realizar la caracterización de las células sanguíneas de los patos en las especies *A. clypeata* y *A. acuta*.

#### Caracterización de las células sanguíneas de patos de las especies *Anas clypeata* y *Anas acuta*

En general, las características morfológicas de las células sanguíneas entre *A. clypeata* y *A. acuta* fueron muy similares, por lo que a continuación se describen los diferentes tipos celulares de manera conjunta para las dos especies.

#### **Eritrocitos**

Los eritrocitos fueron las células sanguíneas más abundantes en *A. clypeata* y *A. acuta*. El tamaño de éstos varió entre 12 y 15  $\mu\text{m}$  para *A. clypeata*, y entre 11 y 15  $\mu\text{m}$  para *A. acuta* (Figura 6). Son células de forma elipsoidal, con un núcleo centrado y de color púrpura, que en eritrocitos maduros presentaron formas elípticas. La cromatina se encontró muy condensada, con citoplasma abundante y de color verde gris a anaranjado-rosado.

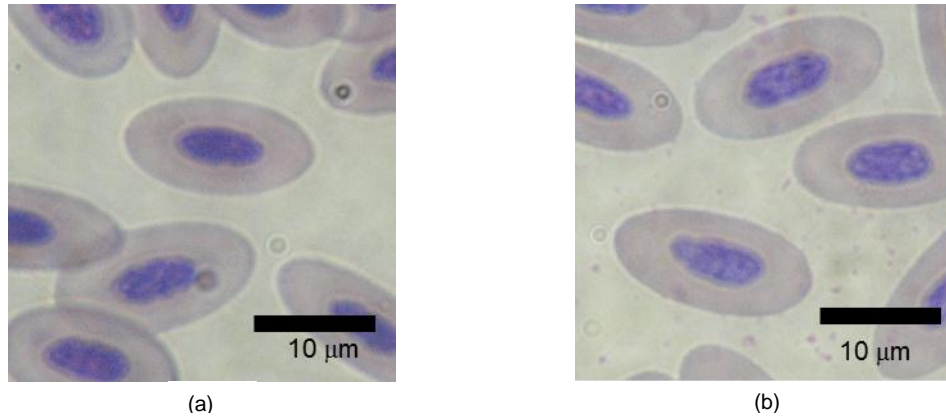


Figura 6. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestran eritrocitos mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).

## Leucocitos

### Linfocitos

Los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes, ya que de estas células sanguíneas representaron el 74.2 % en *A. clypeata* y el 80.1 % en *A. acuta*. El tamaño de éstos varió entre 5 y 9 µm para *A. clypeata*, y entre 5 y 8 µm para *A. acuta* (Figura 7). Fueron células redondas, su núcleo estuvo algunas veces centrado y de color púrpura. La cromatina se encontró muy condensada. El citoplasma de los linfocitos fue escaso y de un color azul claro. Para este trabajo la caracterización de los linfocitos fue utilizada para poder establecer la relación H/L.

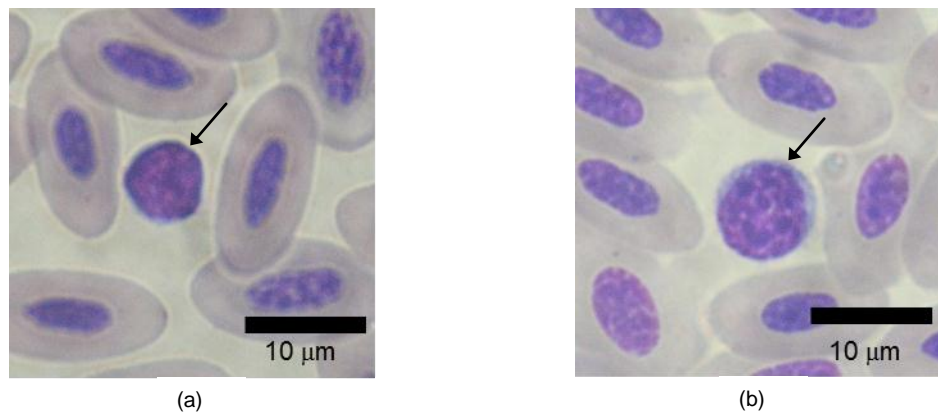


Figura 7. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* (b)*A. acuta* que muestran un linfocito mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).

## Heterófilos

Los heterófilos en los leucocitos representaron el 16.8 % en *A. clypeata* y el 12.8 % en *A. acuta*. El tamaño de los heterófilos observados en las especies *A. clypeata* y *A. acuta* fue entre 9 y 13  $\mu\text{m}$ , y entre 10 y 13  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 8). El núcleo de estas células presentó dos o tres lóbulos visibles y algunas veces estuvo cubierto parcialmente por sus gránulos citoplasmáticos, los cuales fueron de color rojo y en forma de aguja. Las células de ambas especies presentaron formas redondas aunque algunas veces fueron asimétricas. La cromatina fue de color púrpura y el citoplasma de estas células incoloro o ligeramente azul. Además de los linfocitos también se utilizó la caracterización de los heterófilos poder establecer la relación H/L.

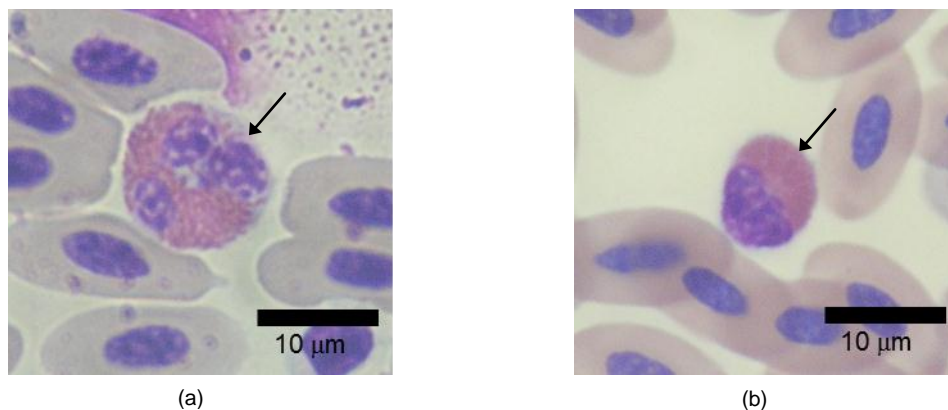


Figura 8. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* mostrando un heterófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).

## Eosinófilos

Los eosinófilos en los leucocitos representaron en *A. clypeata* y en *A. acuta* el 5.6 % y el 4.7 %, respectivamente. El tamaño de éstos varió entre 8 y 13  $\mu\text{m}$ , y entre 9 y 13  $\mu\text{m}$  para *A. clypeata* y *A. acuta*, respectivamente (Figura 9). Presentaron un núcleo con dos o tres lóbulos de color púrpura, frecuentemente más intenso que el de los heterófilos, gránulos rojos redondos más fuertemente teñidos que los de los heterófilos, los cuales cubren al núcleo y un citoplasma colorido un poco más fuerte de azul que el de los heterófilos.

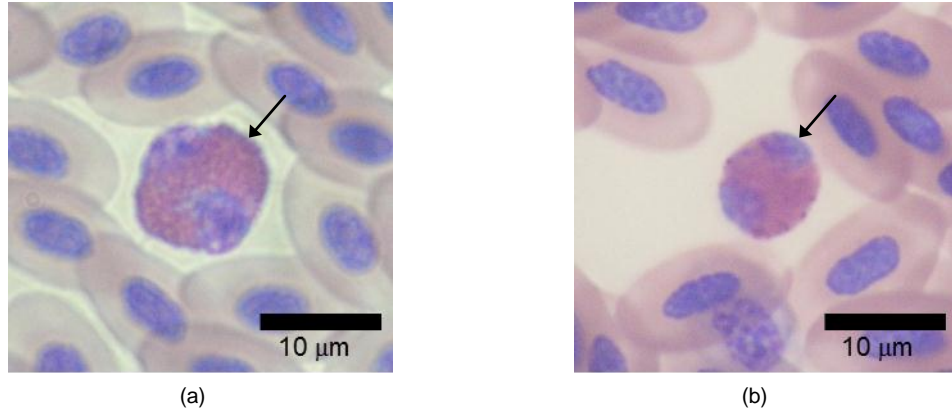


Figura 9. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestran un eosinófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).

### Basófilos

Los basófilos en los leucocitos representaron 1.8 % en *A. clypeata* y 1.3 % en *A. acuta*. El tamaño de éstos para *A. clypeata* y *A. acuta* se encontró entre 7 y 12  $\mu\text{m}$ , y entre 8 y 11  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 10). En estas células no se observó el núcleo debido a que los gránulos de color púrpura que poseen los basófilos cubrieron al núcleo y al citoplasma.

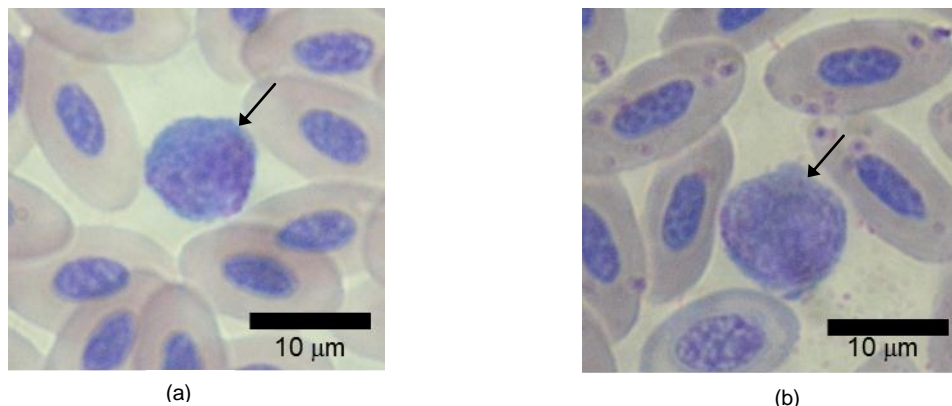


Figura 10. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestran un basófilo mediante la tinción Wright y Giemsa (1000X).

### Monocitos

Los monocitos fueron las células sanguíneas menos abundantes, ya que dentro de los leucocitos representaron el 1.7 % para *A. clypeata* y el 1.1 % para *A. acuta*. Generalmente estas células fueron los leucocitos más grandes en *A.*

*clypeata* y en *A. acuta*, aunque su tamaño varió entre 10 y 16  $\mu\text{m}$  (Figura 11). La forma de los monocitos fue de redonda a ameboide, se observó un núcleo de redondeado a ovalado, aunque algunas veces fue de forma no uniforme y de color violeta, y presentaron una cromatina ligeramente condensada. Algunas veces su citoplasma presentó pseudópodos, fue abundante, de color azul gris y con vacuolas.

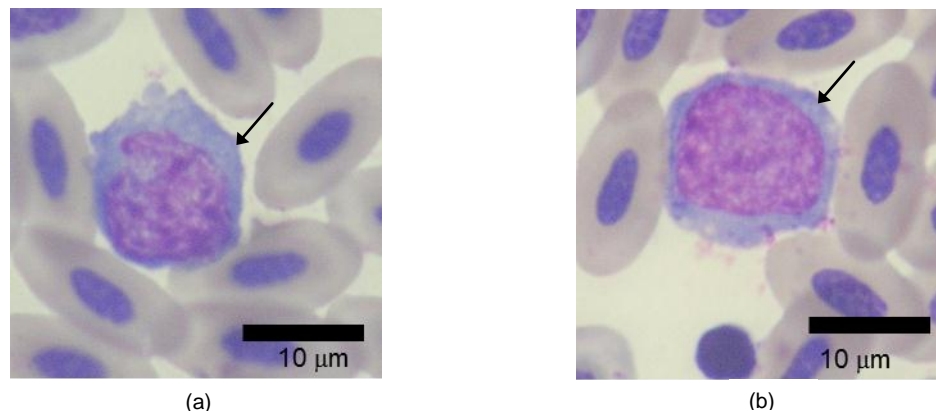


Figura 11. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestra un monocito mediante la tinción Wight y Giemsa (1000X).

Las características que se observaron en los eritrocitos y leucocitos de las especies *A. clypeata* y *A. acuta* son similares a las encontradas por otros autores. Al igual que en el presente estudio, Campbell (2010) también encontró que los eritrocitos maduros de la familia de aves Psittacidae son células de forma elipsoidal, que tienen un núcleo elíptico y centrado, de color púrpura, la cromatina se encuentra agrupada y el color del citoplasma es anaranjado-rosado. En contraste, en el presente estudio se encontró que el color del citoplasma varió de color verde-gris a anaranjado-rosado. Los resultados de este mismo autor en cuanto a la caracterización de los linfocitos de los psitácidos también coinciden con lo aquí encontrado: Los linfocitos son células redondas, tienen un núcleo que puede estar o no centrado y en linfocitos maduros la cromatina está fuertemente agrupada; el citoplasma de los linfocitos pequeños maduros es escaso y de un color azul claro.

También Campbell (2010) coincide con los resultados del presente estudio en cuanto a la caracterización de los heterófilos de los psitácidos, ya que este autor encontró que son células redondas, que su núcleo puede tener dos o tres lóbulos, y que éste puede estar parcialmente oculto por los gránulos citoplasmáticos. De la misma manera que se encontró en el presente estudio, Latimer y Bienzle (2010) encontraron que los gránulos en los heterófilos de las aves son de color rojo pálido y frecuentemente en forma de aguja. Además, Campbell (2010) encontró que estas células tienden a ser redondas, con una cromatina de color púrpura y que el citoplasma de las células maduras es incoloro, a diferencia de lo encontrado en el presente estudio en donde se observó que los heterófilos también pueden tener una forma asimétrica, además de que el color del citoplasma vario de incoloro a ligeramente azul.

En los eosinófilos de los psitácidos, Campbell (2010) encontró que poseen un núcleo lobulado y, según (Latimer y Bienzle, 2010), los eosinófilos de las aves contienen gránulos redondos, de color naranja-rojo y su citoplasma es ligeramente azul, lo que concuerda con los resultados del presente estudio en donde se observó que el núcleo puede poseer dos o tres lóbulos.

En los basófilos de los Psitácidos, Campbell (2010) encontró que poseen un núcleo no lobulado y unos gránulos que frecuentemente oscurecen el núcleo, lo que coincide con lo encontrado en el presente estudio en donde se observó que los gránulos cubren tanto al núcleo como al citoplasma.

Al igual que en este estudio, Latimer y Bienzle (2010) encontraron que generalmente en las aves, los monocitos son los leucocitos más grandes. La forma de estas células es de redonda a ameboide, contienen un núcleo de redondeado a ovalado, una cromatina ligeramente condensada, su citoplasma es abundante y de color azul gris (Campbell, 2010), y pueden poseer pseudópodos (Latimer y Bienzle, 2010); en el presente estudio, además, se observó la presencia de vacuolas en el citoplasma.

## Índice H/L

La relación **heterófilo/linfocito (H/L)** es un indicador de estrés, de la condición inmunológica y por lo tanto de la salud de los organismos. Esta relación puede variar cuando las aves son privadas de alimento (Gross y Siegel, 1986), y cuando son expuestas a contaminantes (Grasman y Scanlon, 1995). En este estudio, el promedio del índice H/L en *A. clypeata* fue 0.28, con valor máximo y mínimo de 1.329 y 0.055, respectivamente, y para *A. acuta*, el promedio del índice H/L fue 0.177, con valor máximo y mínimo de 0.472 y 0.011, respectivamente (ANEXO VI). No se encontraron diferencias significativas entre *A. clypeata* y *A. acuta* ( $H=4.248$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.236$ ) (Figura 12). Para las hembras de *A. clypeata*, el promedio del índice H/L fue 0.34, y para los machos 0.169. Los promedios del índice H/L en hembras y en machos de *A. acuta* fueron 0.105 y 0.202, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre sexos de una misma especie ( $P=0.236$  tanto para *A. clypeata* como para *A. acuta*) (Figura 12).

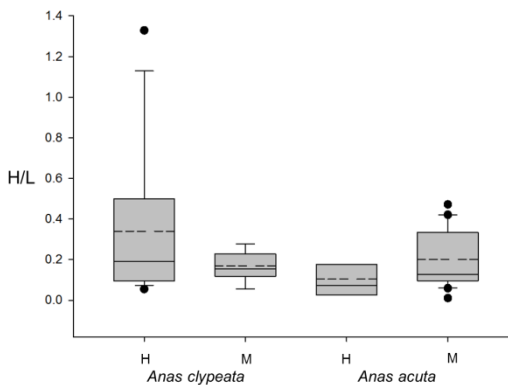


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes que indican la comparación entre especies (*A. acuta* y *A. clypeata*) y sexo respecto a H/L: Índice heterófilo/linfocito; H:Hembras y M:Machos.

Anteriormente ya se mencionó que en el índice H/L no existen diferencias significativas entre especies y entre sexos, sin embargo, las diferencias encontradas en el presente estudio, aunque no fueron significativas, pueden deberse a lo que mencionan Carere et al. (2005), que los individuos de una



misma especie pueden diferir en sus respuestas de comportamiento al estrés o al miedo, e inclusive dentro de la misma edad, sexo y bajo condiciones estandarizadas. Respecto a las diferencias no significativas entre sexos, Campo y Davila (2002), reportaron que una vez que los machos de codornices castellanas alcanzaban la madurez sexual, tenían significativamente mayor relación H/L que las hembras, lo que indica que los machos son más sensibles al estrés que las hembras. Según Laiolo et al. (2009) el sexo es un importante predictor de la vulnerabilidad al estrés, ya que en la chova piquirroja (*Pyrrhocorax pyrrhocorax*), las hembras adultas tienen mayores índices H/L que los machos antes de la puesta de huevos, ya que se enfrentan a mayores costos energéticos.

Gross y Siegel (1983) en Campo y Davila (2002) sugieren que valores de la relación H/L de 0.2, 0.5 y 0.8 son característicos de estrés bajo, medio y alto, respectivamente, de acuerdo con este autor, en el presente estudio, dos hembras de *A. clypeata* muestran un estrés alto, además, fueron de los organismos de esta especie que presentaron menores IC.

### **7.1.3. Evaluación de respuestas citogenéticas**

En general las morfologías de las anomalías nucleares entre *A. clypeata* y *A. acuta* fueron muy similares, por lo que a continuación se describen de manera conjunta para las dos especies.

#### **Micronúcleos**

Los MN fueron observados tanto en los eritrocitos policromáticos (EPC), como en los normocromáticos. Son pequeños cuerpos de forma redonda que se

encuentran en el citoplasma, con el mismo color y plano óptico que el núcleo principal y además no están conectados a él (Figuras 13, 14a y 14b).

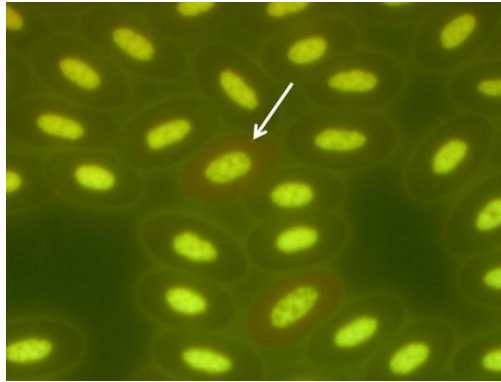


Figura 13. Frotis sanguíneo de patos de las especies *A. clypeata* que muestra eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).

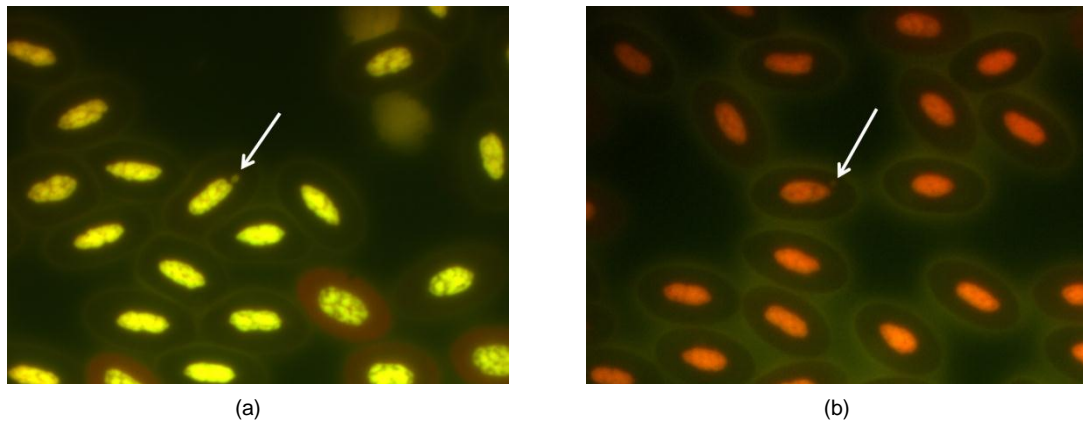


Figura 14. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a) *A. clypeata* y (b) *A. acuta* que muestra eritrocitos normocromáticos micronucleados (EMN) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).

### **Prolongaciones nucleares**

Las prolongaciones nucleares fueron observadas tanto en los eritrocitos policromáticos como en los normocromáticos. Son protuberancias que

proviene del núcleo principal, pero que no están separadas de él (Figuras 15a y 15b, y 16a y 16b).

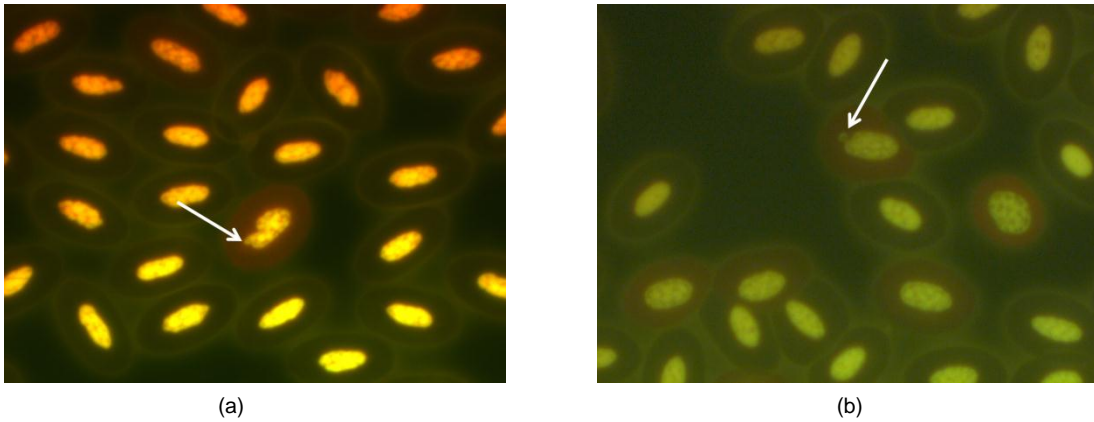


Figura. 15. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestra eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares (BC) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).

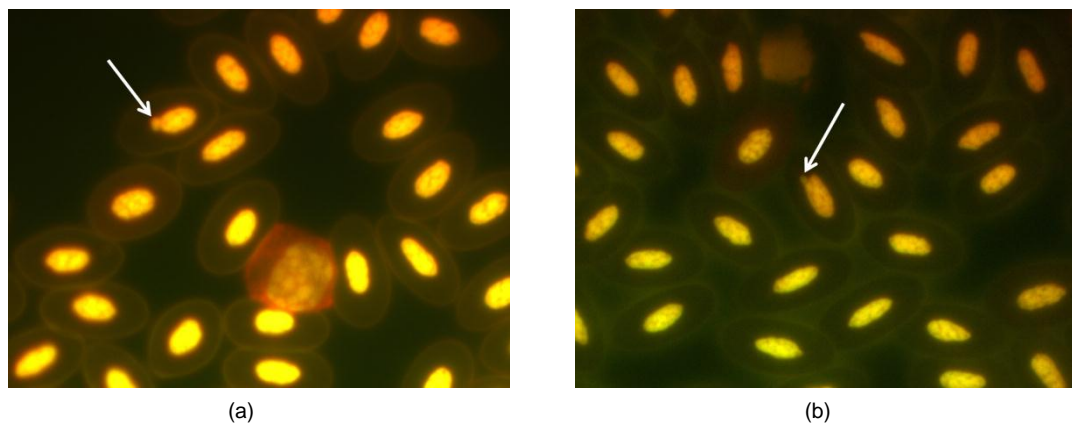


Figura. 16. Frotis sanguíneo de patos de las especies (a)*A. clypeata* y (b)*A. acuta* que muestra eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares (EBC) mediante la tinción naranja de acridina (1000X).

Los **EPC** son eritrocitos inmaduros que en 24 h aproximadamente alcanzan su madurez (Schmid, 1975); el conteo de estas células es muy utilizado para evaluar la citotoxicidad eritropoyética provocada por agentes tóxicos (Cavas, 2008) como los contaminantes ambientales. En el presente estudio el promedio de la frecuencia de eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocitos totales (EPC/10,000 ET) para *A. clypeata* fue de 545.05, con valor máximo y mínimo de 1043 y 190, respectivamente. Para *A. acuta* el promedio fue de 487.955, con valor máximo y mínimo de 984 y 236, respectivamente (ANEXO VII). No se observan diferencias significativas entre especies ( $F=0.187$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.905$ ) (Figura 17a). El promedio de la frecuencia de EPC/10,000 ET en hembras de *A. clypeata* fue de 565.786, y en machos de 496.667, y para hembras y machos de *A. acuta* fue de 481.667 y 490.313, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre sexos de la misma especie ( $P=0.905$  para ambas especies) (Figura 17a).

Alghazal et al. (2008) al tratar a ratas con trihidrato de acetato de plomo encontraron una disminución del índice de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos en la médula ósea de machos, lo que significa que el trihidrato de acetato de plomo le provocó citotoxicidad a este sexo. Cavas (2008) afirma que el acetato de plomo y el cloruro de mercurio interfieren con la proliferación de los eritrocitos, esto podría ser provocado por lo sugerido por Oliveira-Ribeiro et al. (2006), que tanto el Hg como el Pb evitan la síntesis del grupo hemo debido a la inhibición de la enzima delta aminolevulínico deshidratasa.

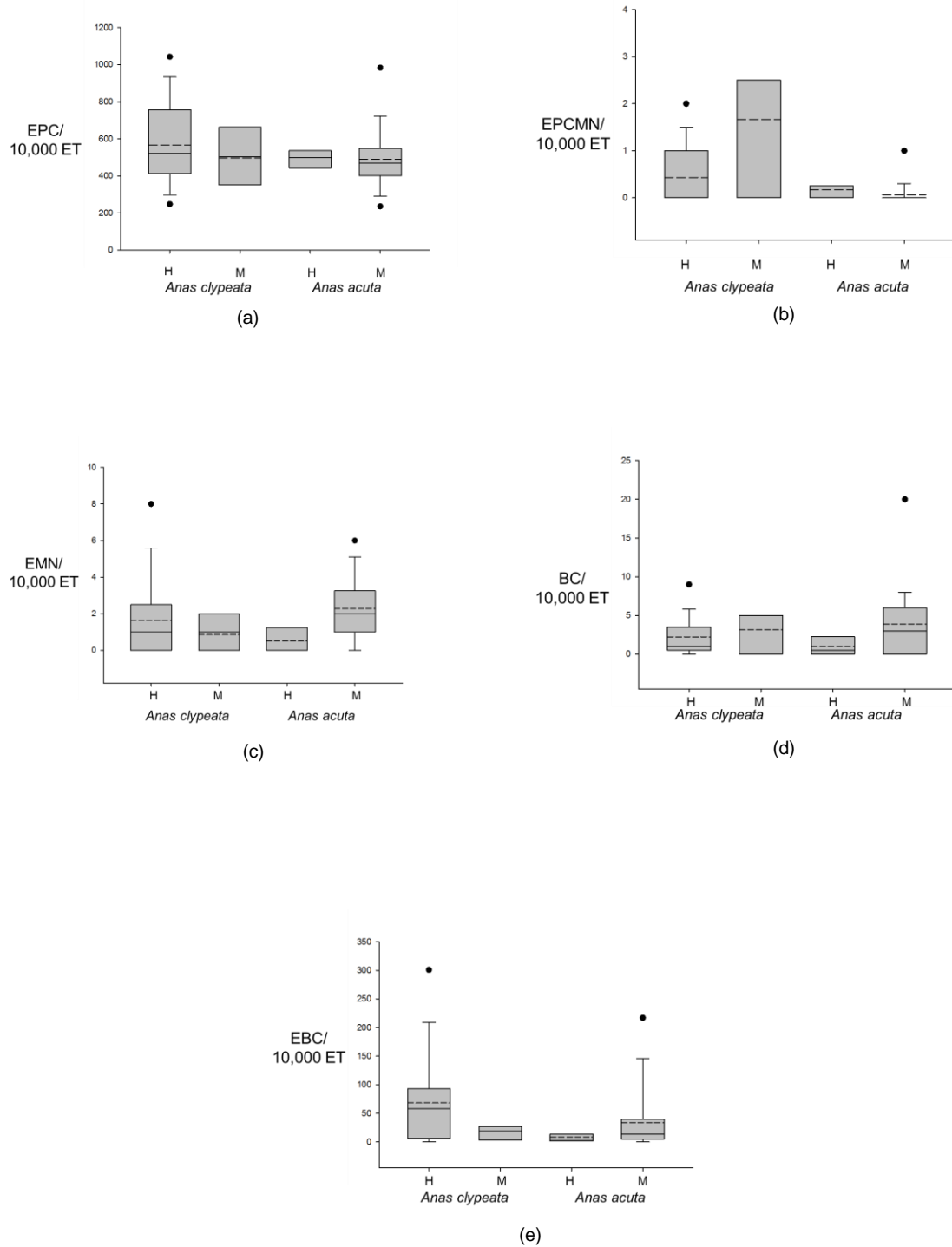


Figura 17. Diagrama de cajas y bigotes que indican comparación entre especies (*A. acuta* y *A. clypeata*) y sexo respecto a (a)(EPC/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocitos totales; (b)(EPCMN/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; (c)(BC/10,000 ET):Eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos policromáticos; (d)(EMN/10,000 ET):Eritrocitos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; y (e)(EBC/10,000 ET):Eritrocitos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales; H:Hembras; M:Machos; —Mediana y ----Media.

Los MN son alteraciones que se pueden formar por reparaciones no corregidas, o mal corregidas en la estructura del ADN al existir una exposición a un agente genotóxico (Shugart, 1994); algunos mecanismos que pueden estar involucrados en la formación de MN son la rotura del cromosoma y la disrupción del huso (Maluf et al., 2001). Como anteriormente se mencionó, la presencia de MN en eritrocitos policromáticos (EPCMN) es una herramienta muy útil, ya que los EPC son eritrocitos jóvenes que en aproximadamente 24 h alcanzan su madurez (Schmid, 1975), por lo que la aparición de MN en los EPC acontecerá dentro de 24 h de la exposición a agentes genotóxicos (Gómez-Meda et al., 2006). Respecto al promedio de la frecuencia de eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocitos totales (EPCMN/10,000 ET) para *A. clypeata*, éste fue de 0.8, con valor máximo y mínimo de 10 y 0, respectivamente, para *A. acuta* fue de 0.0909, con valor máximo y mínimo de 1 y 0, respectivamente (ANEXO VII). No se observaron diferencias significativas entre especies ( $H=3.685$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.298$ ) (Figura 17b). Tanto para las hembras como para los machos de *A. clypeata*, el promedio de la frecuencia de EPCMN/10,000 ET fue de 0.429 y 1.667, respectivamente; para las hembras de *A. acuta* el valor fue de 0.167, y para machos de 0.0625. No se observaron diferencias significativas entre sexos de la misma especie ( $P=0.298$  para ambas especies) (Figura 17b).

De igual manera, Alghazal et al. (2008) al tratar a ratas con trihidrato de acetato de plomo, también encontraron un incremento significativo respecto al control en el número total de EPCMN en la médula ósea de machos y hembras, lo que significa que, además de haber provocado citotoxicidad en machos, también provocó genotoxicidad en ambos sexos. Tal vez la razón por la cual en los machos tratados con trihidrato de acetato de plomo se presentó citotoxicidad, se deba a que este sexo es más susceptible a los contaminantes, ya que según Burger et al. (2007) en mamíferos, las hembras eliminan los xenobióticos a través del embarazo y la lactancia. Esta situación también pudo haber acontecido en el estudio realizado por Jagetia y Aruna (1998), quienes observaron que en ratones machos y hembras tratados con nitrato de plomo, se presentó un incremento significativo en la frecuencia de EPCMN y EPC, sin

embargo, los machos resultaron ser más sensibles a la inducción de MN debido a las más altas frecuencias de EPCMN; en cambio, parece ser que en el presente estudio, no existe un sexo de *A. clypeata* y *A. acuta* que tenga significativamente mayor frecuencia de EPC o EMN, quizás ambos sexos son de igual manera susceptibles a algún agente citotóxico o genotóxico, o bien, las frecuencias que se observan son inherentes a las especies.

La frecuencia de **MN en los eritrocitos normocromáticos (EMN)** nos puede indicar una exposición crónica a un contaminante (Gómez-Meda et al., 2006), ya que la vida promedio de los eritrocitos de las aves es aproximadamente de 25 a 45 días, según la especie (Schalm, 1964 en Gomez-Meda et al., 2006). Para este estudio, el promedio de la frecuencia de eritrocitos normocromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales (EMN/10,000 ET) para *A. clypeata* fue de 1.45, con valor máximo y mínimo de 8 y 0, respectivamente, para *A. acuta* el promedio fue de 1.714, con valor máximo y mínimo de 6 y 0, respectivamente (ANEXO VII). No se presentaron diferencias significativas entre especies ( $H=7.425$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.060$ ) (Figura 17d). Respecto al sexo, para las hembras de *A. clypeata*, el promedio de la frecuencia de EMN/10,000 ET fue de 1.714, y para los machos de 0.833, en el caso de las hembras y de los machos de *A. acuta*, los valores fueron 0.5 y 2.2, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre sexos de la misma especie ( $P=0.060$  en ambas especies) (Figura 17c).

Zúñiga-González et al. (2005) administraron a los primates *Callithrix jacchus* del nuevo mundo (que se encuentran en el sur y en el centro de América) dosis pediátricas de metotrexato (MTX), ciclofosfamida (CP), citosina-arabinósido (Ara-C) o 5-Fluorouracilo (5-FU). El resultado fue un incremento en la frecuencia de los EPCMN en los primates expuestos a MTX, CP y Ara-C y un incremento en los EMN en los expuestos a 5-FU; además, considerándose la frecuencia de los EMN presentados en este mismo estudio para otros primates del nuevo mundo, como *Saguinus midas* y *Ateles sp.* y para primates del viejo del mundo (se encuentran en África, Asia y Europa) como *Pan troglodytes*,

*Cercopithecusa ethiops* y *Macaca fascicularis*, estos autores encontraron evidencias de que los primates del nuevo mundo tienen significativamente más altas frecuencias de MN que los primates del viejo mundo. Estos últimos primates tienen un mejor sistema retículo endotelial con una mayor capacidad de remover los eritrocitos con alteraciones, pero en ambos casos se puede evaluar la genotoxicidad de los agentes químicos. La razón por la cual estos autores encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los EMN entre los primates del nuevo y del viejo mundo, podría ser debido a que pertenecen a diferentes familias, en cambio *A. clypeata* y *A. acuta* utilizadas en el presente este estudio pertenecen a la misma familia, por lo que podría ser que ambas especies presentan una eficiencia similar en lo referente al sistema retículo endotelial, para remover los eritrocitos MN.

El número de la frecuencia de MN puede variar no sólo entre especies sino también entre ambos sexos (Zúñiga et al., 1996). En algunas especies, el órgano encargado de remover los eritrocitos viejos o los que contienen MN es el bazo (o el resto del sistema retículo-endotelial) (Zúñiga-González et al., 2000). Los organismos con valores de EMN cercanos a cero, tienen un sistema de remoción de EMN de la circulación sanguínea muy eficiente; así es que al ser expuesto a agentes que provocan MN, los niveles de EMN en la sangre no se incrementan (Zúñiga et al., 1996). El promedio de la frecuencia de MN/10,000 ET tanto en los eritrocitos inmaduros como en los maduros para *A. clypeata* y *A. acuta* fue de 1.13 y 0.88, respectivamente. Esto podría indicar que dentro del género *Anas*, ambas especies podrían ser potencialmente consideradas como bioindicadoras de agentes genotóxicos micronucleogénicos, ya que comparando los valores promedios de MN/10,000 eritrocitos reportados para otras especies del orden de los Anseriformes son como sigue: 0.2 para *Cygnus* sp. (cisne); 0 para *Chen caerulescens* (ganso) y 0.2 para *Anas platyrhynchos* (pato silvestre). Y los promedios de MN/10,000 eritrocitos para otras especies son: 0 para *Polyborus plancus* (cresta caracaca); 2.2 para *Gallus domesticus* (pollos); 5.1 para *Aratinga canicularis* (perico frente roja); 2.1 para *Meleagris*



*gallopavo* (pavo común) y 10.6 para *Otus asio* (búho) (Zúñiga-González et al., 2000).

El promedio de la frecuencia de **eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares**/10,000 eritrocitos totales (**BC/10,000 ET**) en *A. clypeata* fue de 1.9, con valor máximo y mínimo de 9 y 0, respectivamente, y para *A. acuta* el promedio fue de 3, con valor máximo y mínimo de 20 y 0, respectivamente (ANEXO VII). No se observaron diferencias significativas entre especies ( $H=3.945$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.268$ ) (Figura 17d). El promedio de la frecuencia de BC/10,000 ET en hembras de *A. clypeata* fue de 2.286 y en machos de 1; para hembras y machos de *A. acuta* los valores máximo y mínimo fueron 1 y 3.75, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre sexos de la misma especie ( $P=0.268$  para ambas especies) (Figura 17d).

Las prolongaciones nucleares son alteraciones morfológicamente similares a los MN, pero con la diferencia de que sí están unidos al núcleo (Rybakovas et al., 2009) y además pueden ser indicadoras de genotoxicidad (Serrano-García y Montero-Montoya, 2001). Al igual que en los EPC, los MN aparecen dentro de las 24 h de exposición a agentes genotóxicos (Gómez-Meda et al., 2006); lo mismo podría suceder en el caso de que los EPC presenten prolongaciones nucleares.

La presencia de las **prolongaciones nucleares en los eritrocitos normocromáticos (EBC)** también puede ser un indicador de genotoxicidad (Serrano-García y Montero-Montoya, 2001), que indica una exposición crónica a un contaminante. Para el presente estudio, el promedio de la frecuencia de EBC/10,000 ET para *A. clypeata* fue de 47.75, con valor máximo y mínimo de 186 y 0, respectivamente. Para *A. acuta* el promedio fue de 20.818, con valor máximo y mínimo de 146 y 0, respectivamente (ANEXO VII). No se observaron diferencias significativas entre especies ( $H=5.948$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.114$ ) (Figura 17e). Y por último, para las hembras de *A. clypeata* el promedio de la frecuencia de EBC/10,000 ET fue de 56.643 y para los machos de 27; tanto para las hembras como para los machos de *A. acuta*, el valor máximo y mínimo fueron 8.333 y

25.5, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre sexos de la misma especie ( $P=0.114$  en ambas especies) (Figura 17e).

Cavas (2008) encontró que la exposición de los peces *Carassius auratus auratus* al acetato de plomo y al cloruro de mercurio aumentaba significativamente la frecuencia de EBC y de EMN en la sangre periférica, respecto al control, y que ambas frecuencias mostraban una correlación positiva significativa. También encontró que tanto el acetato de plomo como el cloruro de mercurio provocaban una disminución en el porcentaje de los EPC. Bolognesi et al. (2006) exponen que las diferentes frecuencias de las anomalías nucleares están relacionadas con agentes genotóxicos que provocan daños mediante diferentes mecanismos de acción. Podría ser que en el presente estudio, las frecuencias de BC y EBC encontradas en *A. clypeata* y *A. acuta* se deben a un daño provocado por algún agente genotóxico, o bien ser inherentes a las especies.

#### **7.1.4. Contaminantes**

##### **7.1.4.1. Niveles de Hg y Pb en plumas**

El **Hg** es tóxico tanto en su forma inorgánica como orgánica, pero al encontrarse en su forma orgánica se incrementa su lipoficidad y por lo tanto incrementa su capacidad para cruzar las membranas biológicas, almacenarse en los depósitos de grasa, y ser adsorbido por los sedimentos (Walker, 2001). El metilmercurio ingerido por medio del alimento es absorbido a través de la sangre (Kahle y Becker, 1999), y de ahí se distribuye al hígado, riñones, cerebro, bazo y músculo, siendo en aves fácilmente removido del músculo a través de la muda (Evers et al., 2005), pues durante este proceso, disminuyen los niveles de algunos metales pesados, ya que éstos son secuestrados en las plumas (Zamani et al., 2009) mediante la interacción del Hg y sus derivados con

los grupos R-SH (Baatrup, 1991). Cuando las plumas dejan de crecer, son aisladas fisiológicamente por lo que no pueden incorporar más Hg (Kahle et al., 1999), de esta manera, la muda es un mecanismo mediante el cual disminuyen los niveles de este metal en los órganos internos (Braune y Gaskin, 1987b).

Respecto al presente estudio, la concentración promedio de Hg encontrada en las plumas de *A. clypeata* fue de 0.625 mg/Kg, con valor máximo y mínimo de 2.201 y 0.067, respectivamente. En las plumas de *A. acuta* la concentración promedio de Hg fue de 0.137 mg/Kg, con valor máximo y mínimo de 0.483 y 0, respectivamente (ANEXO VIII). Los resultados indicaron que la concentración de Hg fue significativamente mayor en *A. clypeata* respecto a *A. acuta* ( $H=24.787$ ,  $gl=3$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 18a). La concentración promedio de Hg que se encontró en las plumas de las hembras de *A. clypeata* fue de 0.566 mg/Kg y en las de los machos fue de 3.061. Para *A. acuta*, la concentración promedio que se encontró en las plumas tanto de hembras como de machos fue de 0.135 y 0.138 mg/Kg, respectivamente. Respecto al sexo en una misma especie no se observaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) (Figura 18a). Las concentraciones de Hg en las plumas de las hembras de *A. clypeata* fueron significativamente mayores que las concentraciones en las plumas de las hembras de *A. acuta* ( $P<0.05$ ). De la misma manera las concentraciones de Hg en las plumas de los machos de *A. clypeata* fueron significativamente mayores que las concentraciones en las plumas de los machos de *A. acuta* ( $P<0.05$  para ambas especies) (Figura 18a).

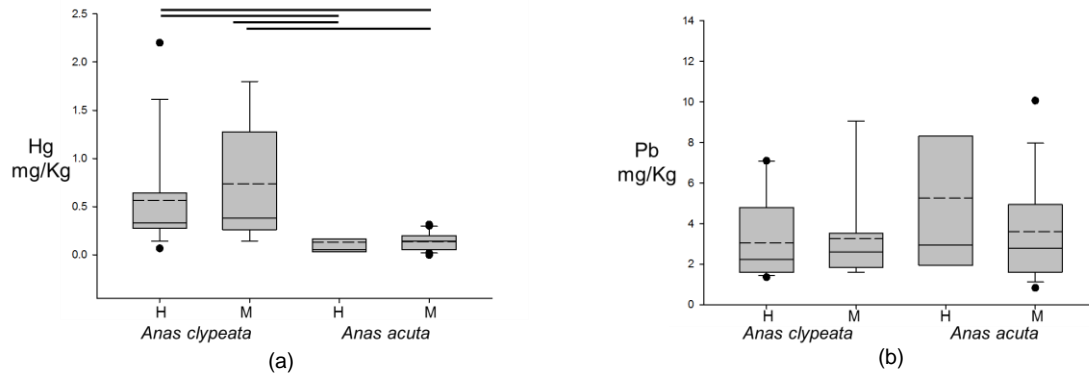


Figura 18. Diagrama de cajas y bigotes que indica la comparación entre especies (*A. acuta* y *A. clypeata*) y sexo respecto a (a) Hg y (b) Pb en plumas; (Hg mg/Kg): Concentración de Hg; (Pb mg/Kg): Concentración de Pb; H: Hembras; M: Machos. — Mediana, ---- Media. Las líneas horizontales que conectan entre grupos significan diferencias significativas.

La bioacumulación de contaminantes asociados a sedimentos depende de los organismos bentónicos, ya que es común que se alimenten del sedimento (Watling, 1991; Gewurtz et al., 2000) y particularmente de aquellos que consumen sedimentos con alto contenido de carbón orgánico (Lee, 1991 en Barron, 2003). En el sedimento, las sustancias húmicas son las que más absorben metales (Fu et al., 1992). Otros factores que pueden influir en la bioacumulación de los metales a partir de sedimentos son la transformación (por ejemplo, la metilación), la química del sedimento (salinidad, redox, pH) y la combinación con la materia orgánica disuelta (Bryan y Langston, 1992), que es una fuente importante de energía para las cadenas tróficas basadas en el bentos (Farrington, 1991; Bryan y Langston, 1992). Una vez introducidos los contaminantes mediante el bentos a la cadena trófica, estos se biomagnifican (Bryan y Langston, 1992).

Las mayores concentraciones de Hg en las plumas de *A. clypeata* respecto a *A. acuta* podría deberse a que la primera especie se alimenta frecuentemente del fondo cuando el agua es poco profunda (Dubowy, 1996), lo que incrementa el potencial de exposición al metilmercurio asociado al sedimento (Clarkson, 2002) o en los invertebrados bentónicos (Hall et al., 2009). La especie *A. acuta*, en

contraste, presenta hábitos alimenticios diferentes, con un consumo mayor de plantas que animales (Hall et al., 2009).

Los resultados de Hang et al. (2011) sobre la concentración de Hg en plumas coinciden con el resultado del presente trabajo. Estos autores analizaron en diez aves del martinete común (*Nycticorax nycticorax*) los metales Hg, As, Cd, Cr, y Pb, y encontraron que tanto las concentraciones de As en hígado como las de Hg en plumas eran significativamente más altas en machos que en hembras, mientras que Cr y Pb no fueron detectados en estos tejidos. Por otro lado, Seco-Pon et al. (2011) no encontraron diferencias en la concentración de Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn entre sexos en plumas del albatros de ceja negra (*Thalassarche melanophrys*), pero sí diferencias significativas en concentraciones respecto al tamaño del cuerpo entre sexos. Los autores mencionan que la edad, las estrategias de forrajeo respecto al sexo, y el tiempo que invierten las aves detrás de su presa pueden influir en la concentración de los metales. Además Braune y Gaskin (1987a) encontraron que las hembras de la gaviota de bonaparte (*Larus philadelphia*) eliminan mayor cantidad de Hg que los machos durante la muda de otoño.

Una posible explicación sobre las mayores concentraciones de Hg en plumas de machos en ambas especies puede encontrarse en lo reportado por Braune y Gaskin (1987b) y Ochoa-Acuña et al. (2001), quienes observaron que en las plumas de las aves se encuentra entre el 70 y el 93 % del total del Hg del cuerpo (sin contar las plumas). Según Braune y Gaskin (1987a), las hembras, además de eliminar este metal a través de la excreción y las plumas, también lo eliminan a través de los huevos, mientras que los machos no cuentan con esta última vía de eliminación. El Hg induce el adelgazamiento y la reducción del tamaño del huevo, la deformación de la cáscara, y la inhibición de la producción de huevos (Lundholm, 1995; Zamani et al., 2009), lo que podría conducir a la disminución de la población (Burger et al., 2007).

El **Pb**, al igual que el Hg, es tóxico tanto en su forma inorgánica como orgánica, pero al encontrarse en su forma orgánica, se incrementa su lipoficidad, por lo

tanto aumenta su capacidad para cruzar las membranas biológicas, almacenarse en los depósitos de grasa, y ser adsorbido por los sedimentos, y en ambas formas tiene la capacidad de combinarse con los grupos sulfidrilos (Walker, 2001). De esta manera el Pb pasa a formar parte de las plumas de las aves (Bortolotti, 2010) lo que provoca una disminución en la carga total de Pb (Zamani et al., 2009), ya que las plumas tienen un constante suministro de sangre dentro de las 2-4 semanas de su formación; una vez concluido su crecimiento, se interrumpe este suministro, y quedan las plumas como un registro de los metales pesados que se encontraban en la circulación sanguínea (Burger y Gochfeld, 2000).

En el actual estudio, la concentración promedio de Pb que se encontró en plumas de *A. clypeata* fue de 3.127 mg/Kg, con valor máximo y mínimo de 9.063 y 1.357 mg/Kg, respectivamente. En las plumas de *A. acuta*, la concentración promedio de Pb fue de 4.09 mg/Kg, con valor máximo y mínimo de 11.967 y 0.835 mg/Kg, respectivamente (ANEXO VIII). Los resultados de Pb en plumas no indicaron diferencias significativas entre *A. clypeata* y *A. acuta* ( $H=2.23$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.526$ ) (Figura 18b). La concentración promedio de Pb en las plumas de las hembras de *A. clypeata* fue de 0.738 mg/Kg y en las de los machos fue de 3.252 mg/Kg. Para *A. acuta*, la concentración promedio en hembras y machos fue de 5.261 y 3.608 mg/Kg, respectivamente. Respecto al sexo en una misma especie no se encontraron diferencias significativas ( $P=0.526$  para ambas especies) (Figura 18b).

Existen algunos estudios sobre la determinación de Pb en otros tejidos que demuestran que los organismos herbívoros poseen mayor cantidad de Pb que los carnívoros. Por ejemplo, Tsipoura et al. (2011) encontraron mayores concentraciones de Pb en huevos en los gansos (*Branta canadensis*; 161 ppb) que son herbívoros, comparados con los ánades real (*Anas platyrhynchos*; 62.1 ppb) que son omnívoros y con el tordo sargento (*Agelaius phoeniceus*; 38.5 ppb) que son insectívoros (Tsipoura et al., 2008), sin embargo, encontraron que

estos últimos tenían mayores concentraciones de Hg que los omnívoros y que los herbívoros. Asimismo, Di Giulio y Scanlon (1984) encontraron que generalmente las especies herbívoras de la familia Anatidae provenientes de la Bahía de Chesapeake, USA tenían mayores concentraciones de Pb en el tejido (18 y 12.4  $\mu\text{g/g}$ ) que las especies omnívoras (5.4 y 5.1  $\mu\text{g/g}$ ) y carnívoras (7.1 y 5.4  $\mu\text{g/g}$ ). Tsipoura et al. (2011) exponen que el Pb no se biomagnifica a través de la cadena alimenticia marina, por tal motivo altas concentraciones de Pb pueden encontrarse en los menores niveles tróficos.

Cheraghi et al. (2011) indican que algunas plantas son hiperacumuladoras de metales como el Pb, mientras que Tsipoura et al. (2011) señalan que dichas plantas extraen eficientemente el Pb del suelo. Aunque en el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas entre hembras y machos de ambas especies de aves, se observa una ligera tendencia de mayores concentraciones en las hembras; de éstas, son las hembras de *A. acuta* las que presentaron mayores concentraciones. *A. acuta* es una especie omnívora, pero el mayor porcentaje de su alimentación consiste en plantas (Hall et al., 2009), razón por la cual los organismos de esta especie posiblemente presenten mayores concentraciones de Pb en sus plumas que *A. clypeata*. Según Scheuhammer (1987), las aves hembras acumulan mayores cantidades de Pb que los machos, ya que las hembras de *Anas platyrhynchos* a las cuales se les administró perdigones de Pb acumulan diez veces más Pb en el fémur que los machos. Asimismo, Guillemain et al. (2007) encontraron que las hembras de *Anas crecca* ingirieron mayores cantidades de balas usadas para la cacería que los machos, lo que podría explicar las mayores concentraciones de Pb que en las hembras, aunque según Tsipoura et al. (2011) las hembras también eliminan Pb a través de los huevos.

Además de la cacería, otra posible fuente de Pb para Marismas Nacionales es la presencia de once minas de Au y dos de Ag que se encuentran en el estado de Nayarit, a 20 Km de Marismas Nacionales; en todo el estado se encuentran noventa y tres minas de Au y nueve de Ag, en las cuales se produce Pb como

segundo o tercer mineral (INEGI, 2005). Otra posible fuente de este metal son las minas de Au, Ag y Pb que se encuentran en Escuinapa (Servicio Geológico Mexicano, 2011). En el caso del Hg en Marismas Nacionales, las fuentes de este metal podrían ser los aportes de agua dulce del río Cañas, ya que una de las principales actividades en esta cuenca es la minería, que empezó en Sinaloa en el siglo XVI y alcanzó su punto culminante a finales del siglo XIX, pero la producción continuó hasta la década de 1950 y disminuyó en 1970 (García-Hernández et al., 2007). Sin embargo, de acuerdo con el Servicio Geológico Mexicano (2009), en 2008, Sinaloa ocupó a nivel nacional, el décimo lugar en la producción de Au, y sexto en la de Pb; además, García-Hernández et al. (2007) mencionan que posiblemente todas estas minas, que estuvieron activas en el pasado, aún liberan considerables cantidades de Hg hacia la cuenca de Teacapán.

En la Tabla 3 se pueden observar las concentraciones de Hg y Pb en diferentes especies de aves en otras partes del mundo. En esta tabla se aprecia que los valores de Hg encontrados en *A. clypeata* y en *A. acuta* son comparables a los niveles reportados para *Sterna fuscata* (Kojadinovic et al., 2007), *Anser anser* (Lucia et al., 2010) y *Branta canadensis* (Tsipoura et al., 2011), mientras que los valores de Pb encontrados en este estudio, son comparables a los niveles reportados para *Turdus merula* (Scheifler et al., 2006), *Parus major* (Deng et al., 2007) y *Thalassarche melanophrys* (Seco-Pon et al., 2011).

Una concentración de Hg en plumas de 5 mg/Kg está asociada con efectos negativos en muchas especies de aves, como la disminución de la eclosión y del tamaño del huevo (Eisler, 1987). Algunas de las especies que se encuentran en la Tabla 3 contienen concentraciones de Hg por arriba de 5 mg/Kg, que es a la cual se han reportado efectos negativos; por ejemplo, *Larus philadelphia* (Braune y Gaskin, 1987b) y *Nycticorax nycticorax* (Hang et al., 2011).



**Tabla 3. Concentración de Hg y Pb en plumas de aves en diversos sitios en el mundo.**

<b>Especie</b>	<b>Hg mg/Kg</b>	<b>Pb mg/Kg</b>	<b>Lugar de estudio</b>	<b>Referencia</b>
<i>A. acuta</i>		18	Bahía de Chesapeake, USA	Di Giulo y Scanlon, 1984
<i>A. rubripes</i>		12.4		
<i>Bucephala albeola</i>		5.1		
<i>Anas strepera</i>		5.4		
<i>Melanitta fusca deglandi</i>		5.4		
<i>Clangula hyemalis</i>		7.1		
<i>Larus philadelphia</i>	5.237		Quoddy, Canada	Braune y Gaskin, 1987b
<i>Hieraaetus pennatus</i>		0.75	Región de Murcia	Martínez-López et al. 2002
<i>Turdus merula</i>		3.15	Besançon, Francia	Scheifler et al. 2006
<i>Somateria mollissima</i>		0.00489	Amchitka	Burger et al. 2007b
<i>Sterna fuscata</i>	0.23		Archipiélago Glorioso	Kojadinovic et al. 2007
<i>Parus major</i>		3.44	Badachu Park, Beijing, China	Deng et al. 2007
<i>Somateria mollissima</i>	0.000886		Amchitka	Burger et al. 2007b
<i>Sialia sialis</i>	0.09		Virginia, USA	Condon y Cristol, 2009
<i>Anser anser</i>	0.9		Suroeste de la costa atlántica de Francia	Lucia et al. 2010
<i>Nycticorax nycticorax</i>	119	0	Zhengzhou, China	Hang et al. 2011
<i>Branta canadensis</i>	0.258	1.91	NewYork	Tsipoura et al. 2011
<i>Thalassarche melanophrys</i>		4.31	Plataforma Patagónica	Seco-Pon et al. 2011
<i>A. clypeata</i>	0.625	3.127	Marismas Nacionales	Este estudio
<i>A. acuta</i>	0.112	4.09	Marismas Nacionales	Este estudio

Respecto a los organismos del presente estudio, todas las concentraciones de Hg en plumas están por debajo de 5 mg/Kg. Para Pb, una concentración de 4 mg/Kg en plumas, está relacionada con efectos negativos en la termorregulación, la locomoción, y en la percepción de la profundidad (Burger y Gochfeld, 2000). Por ejemplo, las especies *A. acuta*, *A. rubripes*, *Bucephala albeola*, *A. strepera*, *Melanitta fusca deglandi*, *Clangula hyemalis* (Di Giulo y Scanlon, 1984) y *Thalassarche melanophrys* (Seco-Pon et al., 2011) están por arriba de 4 mg/Kg y, *Turdus merula* (Scheifler et al., 2006) y *Parus major* (Deng et al., 2007) se encuentran muy cerca de este valor.

En el presente estudio, el 15.38 % de los organismos de *A. clypeata* y el 29.16 % de los organismos de *A. acuta* tienen una concentración de Pb por arriba de 4 mg/Kg; sin embargo, los organismos que contienen una concentración de Pb cercana a este valor también podrían presentar efectos negativos.

#### 7.1.4.2. Relación entre el peso corporal y la concentración de contaminantes

Algunos estudios, como por ejemplo los de (Monteiro y Lopes, 1990) han mostrado que conforme aumenta la talla del organismo aumenta la concentración de Hg. En el presente estudio, el peso corporal de los organismos muestreados no presentó una correlación positiva con la concentración de contaminantes. El peso corporal de machos de *A. acuta* mostró una correlación negativa significativa con la concentración de Hg en plumas ( $r=-0.478$ ,  $P=0.0331$ ). Resultados similares fueron reportados por Ochoa-Acuña et al. (2002), quienes observaron que, de las 22 especies de aves muestreadas en la costa chilena, las que pertenecían al orden de los Procellariiformes presentaron concentraciones dos veces mayores de Hg, a pesar de mostrar los promedios de peso más bajos. Sin embargo, diversos autores no han encontrado correlación entre el peso y la concentración de Hg en plumas; por ejemplo, Goutner et al. (2007) en polluelos de la especie

*Ardeola ralloides* provenientes del norte de Grecia; Jagoe et al. (2002) en *Haliaeetus leucocephalus* recolectadas en dos consecutivas estaciones de reproducción (1998 y 1999), y Lucia et al. (2010) en *Calidris canutus* y en *Anser anser*, ambas especies muestreadas en el Suroeste de la costa atlántica de Francia.

La ausencia de una correlación positiva entre el peso y la concentración de Hg en plumas, podría ser debida a que solamente fue muestreada una parte de la población de *A. clypeata* y *A. acuta*, por lo tanto no se conoce el verdadero comportamiento del Hg respecto al peso corporal. Otra causa sería que los especímenes no están expuestos considerablemente al Hg, a pesar de que en el área de estudio hay actividad minera y que tanto Rodríguez-Preciado (2004) como García-Hernández et al. (2007) han reportado la presencia de concentraciones elevadas de Hg en peces. Esta última especulación coincide con los niveles de Hg encontrados en ambas especies, los cuales son menores a 5 mg/Kg, que es la concentración a la cual se han reportado efectos negativos en aves.

## 7.2. Relación entre biomarcadores

En seguida se muestran las correspondencias entre los biomarcadores y contaminantes medidos en este trabajo, las posibles causas, y la comparación con otros estudios.

En hembras de *A. clypeata* (Figura 19a) se observó una correlación positiva significativa entre la frecuencia de EPCMN/10,000 ET y EMN/10,000 ET ( $r=0.773$ ,  $P=0.000273$ ), mientras que en machos (Figura 19b) la correlación no es significativa ( $r=0.07$ ,  $P=0.881$ ). La presencia de MN en las hembras de *A. clypeata* pudo ser provocada por un agente genotóxico, lo que coincide con Zúñiga-Gómez et al. (2005), quienes observaron en primates de la especie

*Callithrix jacchus* un incremento de la frecuencia de EPCMN y EMN cuando les dieron a ingerir metotrexato, citosina-arabinósido, ciclofosfamida y 5-fluoracilo, por lo cual los autores exponen que el incremento en la frecuencia de los MN es una evidencia de genotoxicidad.

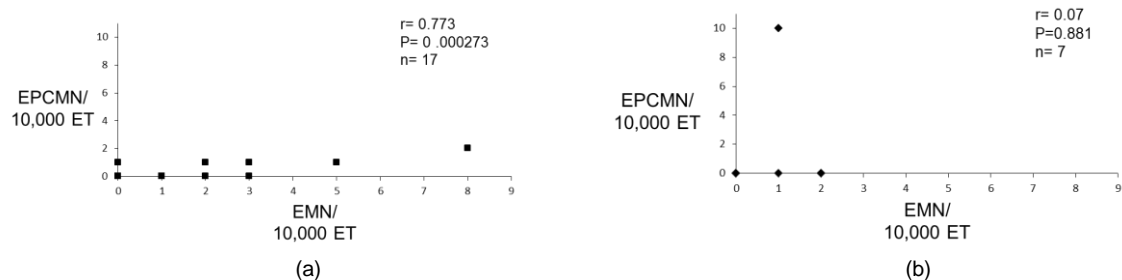


Figura 19. Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales (EPCMN/10,000 ET) y eritrocitos micronucleados normocromáticos/10,000 eritrocitos totales (EMN/10,000 ET) en (a) Hembras y (b) Machos de *A. clypeata*.

Como ya se dijo anteriormente, los EPC son eritrocitos inmaduros que en aproximadamente 24 h alcanzaran su madurez (Schmid, 1975), por lo que la presencia de EPCM nos indica una exposición reciente a genotóxicos, mientras que la frecuencia de EMN puede ser usada para indicar una exposición crónica a contaminantes (Gomez-Meda et al., 2006), ya que la vida promedio de los eritrocitos normocromáticos de las aves es aproximadamente de 25 a 45 días, dependiendo de la especie (Schalm, 1964 en Gomez-Meda et al., 2006), por lo que la correlación obtenida entre la frecuencia de EPCMN/10,000 ET y EMN/10,000 ET podría hablar de una exposición histórica y reciente a genotóxicos (Gómez-Meda et al., 2006), lo que hace suponer que la especie *A. clypeata* está expuesta a algún contaminante de manera continua que podría no ser Hg o Pb, ya que la frecuencia de EPCMN y EMN no mostró una correlación con estos dos metales ( $r=-0.0257$ ,  $P=0.905$  y  $r=0.062$ ,  $P=0.774$ , respectivamente).

En la Figura 20a se observó que en las hembras de *A. clypeata* existe una correlación positiva significativa entre la frecuencia de BC/10,000 ET y EMN/10,000 ET ( $r=0.609$ ,  $P=0.00944$ ), mientras que en los machos (Figura 20b)

la correlación no es significativa ( $r=-0.0578$ ,  $P=0.902$ ). Estudios similares fueron realizados por Rybakovas et al. (2009), quienes analizaron en lenguados (provenientes del mar del Norte y del mar Báltico; ambos con alto grado de contaminación) la frecuencia de EBC y EPCMN en la cabeza del riñón, y de EMN en la sangre periférica, el resultado fue que en los lenguados provenientes del mar del Norte existía mayor frecuencia de anomalías nucleares que en los provenientes del mar Báltico, a pesar de que en esta área hay más contaminación. Los autores mencionan que hay estudios que muestran la adaptación de los organismos a lugares muy contaminados, y que otros indican que hay diferencias genéticas entre las poblaciones que habitan en el mar del Norte y mar Báltico. Además en este mismo estudio, las hembras provenientes del mar del Norte presentaron mayores frecuencias de anomalías nucleares que los machos; al respecto, los autores exponen que hay estudios que revelan que las hembras provenientes de esta área presentan altas prevalencias de tumores en el hígado.

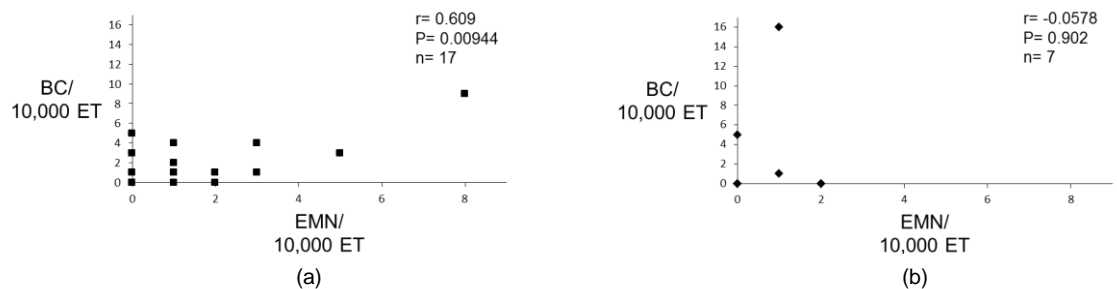


Figura 20. Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (BC/10,000 ET) y eritrocitos normocromáticos micronucleados/10,000 eritrocitos totales (EMN/10,000 ET) en (a) Hembras y (b) Machos de *A. clypeata*.

Lo encontrado para la relación EPCMN/10,000 ET y EMN/10,000 ET concuerda para la relación entre la frecuencia de BC/10,000 ET y EMN/10,000 ET, lo que indica que lo observado en las hembras de *A. clypeata* podría deberse a una exposición continua a genotóxicos (Gómez-Meda et al., 2006). Por su parte Bolognesi et al. (2006) trataron a peces *Scophthalmus maximus* con bisfenol A y tetrabromodifenileter, el resultado fue una correlación entre la frecuencia de EMN y EBC, estos autores afirman que las diferentes frecuencias de las

anormalidades nucleares están relacionadas con agentes genotóxicos que provocan daños mediante diferentes mecanismos de acción. En este sentido, la presencia de ambas anormalidades nucleares en las hembras de *A. clypeata* podría indicar que son el resultado de los diferentes mecanismos de acción provocado por agentes genotóxicos.

Lo observado en la relación EPCMN/10,000 ET y EMN/10,000 ET también concuerda para la relación entre la frecuencia de BC/10,000 ET y EBC/10,000 ET en hembras de *A. clypeata*, lo que indica que lo observado en este sexo podría deberse a una exposición continua a genotóxicos (Gómez-Meda et al., 2006), ya que en hembras de *A. clypeata* (Figura 21a) se observó una correlación positiva significativa entre la frecuencia de eritrocitos con prolongaciones nucleares, tanto en inmaduros como en maduros ( $r=0.606$ ,  $P=0.0099$ ), mientras en machos (Figura 21b) la correlación no es significativa ( $r=0.283$ ,  $P=0.538$ ).

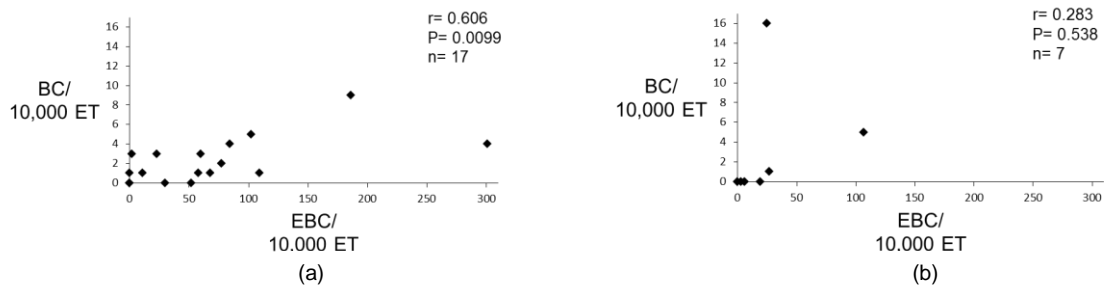


Figura 21. Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (BC/10,000ET) y eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales (EBC/10,000 ET) en (a)Hembras y (b)Machos de *A. clypeata*.

Las prolongaciones nucleares observadas en el presente estudio también son anormalidades nucleares provocadas por agentes genotóxicos (Serrano-García y Montero-Montoya, 2001); al respecto, Gómez-Meda et al. (2006) expusieron a aves *Aratinga canicularis* a diferentes dosis del agente antineoplásico citotóxico mytomicin C, y les midieron la frecuencias de EMN, EPCMN, BC y EBC en eritrocitos. Los autores encontraron que la frecuencia de EPCMN y BC aumentaban en forma paralela.

La relación H/L es un parámetro indicador del estado general de salud en las aves (Kursa et al., 2005), y también es un indicador del estrés ambiental (Gross y Siegel, 1983) que se eleva debido al incremento de corticosterona en plasma (Post y Huuner, 2003), ya que este tipo de corticosteroides inducen heterofilia en las aves muy estresadas (Latimer y Bienzle, 2010).

En hembras de *A. acuta* (Figura 22a) se observa una correspondencia positiva significativa entre la frecuencia de EBC/10,000 ET e índice H/L ( $r=0.879$ ,  $P=0.021$ ), mientras que en machos (Figura 22b) la correlación no es significativa ( $r=0.0296$ ,  $P=0.904$ ).

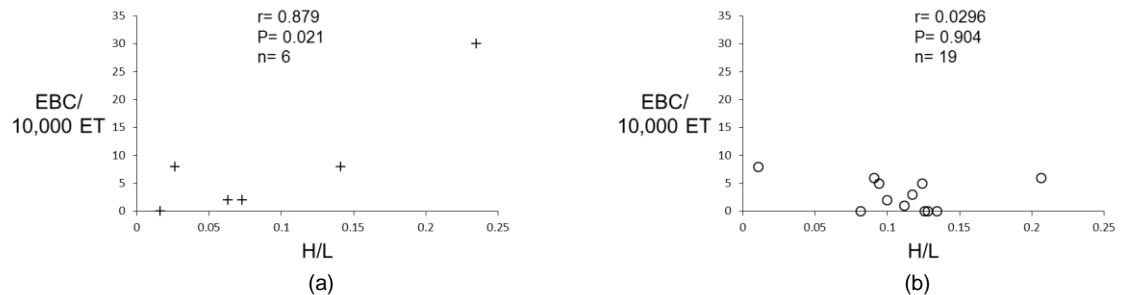


Figura 22. Relación entre la frecuencia de eritrocitos normocromáticos con prolongaciones nucleares /10,000 eritrocitos totales (EBC/10,000 ET) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de *A. acuta*.

Kursa et al. (2005) realizaron un estudio durante el 2001 y 2002, con el pagalo polar (*Catharacta maccormicki*) proveniente de la isla Galíndez, con la finalidad de evaluar las posibles relaciones entre el peso corporal, el recuento diferencial de leucocitos, la relación H/L y la inestabilidad genómica conformada por alteraciones nucleares como MN, EBC, núcleos lobulados y núcleos con cola. Para esto, realizaron una discriminación del grupo moda de los individuos que presentaban valores altos y bajos de los parámetros implicados, sólo en la inestabilidad genómica hubo diferencias significativas respecto a la relación H/L, y también en el peso corporal respecto al recuento de los leucocitos. La relación H/L no fue significativamente diferente en el número de heterófilos y linfocitos,

en las alteraciones genómicas y en el peso corporal. Los autores concluyen que existe cierta correlación entre el peso corporal, la relación H/L y la inestabilidad genómica, por lo que en el presente estudio se podría asumir que las alteraciones nucleares mostradas en la Figura 22a provocaron un incremento en la relación H/L en las hembras de *A. acuta*, y que, además, estas alteraciones fueron inducidas por la exposición de un contaminante diferente de Hg y Pb ( $r=0.179$ ,  $P=0.734$  y  $r=-0.393$ ,  $P=0.441$ , respectivamente).

Tanto el metilmercurio como el Pb evitan la síntesis del grupo hemo debido a la inhibición de la enzima delta aminolevulínico deshidratasa (Oliveira-Ribeiro et al., 2006) lo cual puede afectar en el conteo de los eritrocitos. En la Figura 23a se observa que en hembras de *A. acuta* existe una correlación positiva no significativa entre la frecuencia de EPC/10,000 ET y la concentración de Hg ( $r=0.201$ ,  $P=0.703$ ), y en machos (Figura 23b) se observa lo contrario ( $r=-0.492$ ,  $P=0.0531$ ).

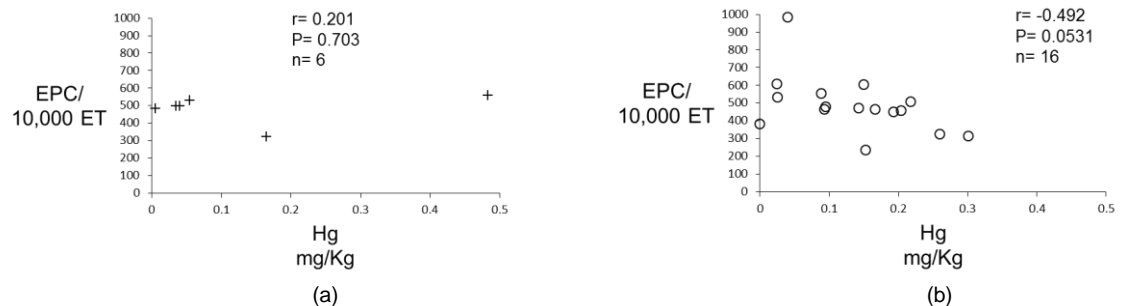


Figura 23. Relación entre la frecuencia de los eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocito totales (EPC/10,000 ET) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de *A. acuta*.

De igual manera, Cavas (2008), encontraron que al exponer a peces *Carassius auratus auratus* al cloruro de mercurio y al acetato de plomo les provocaba una disminución en el porcentaje de los EPC en sangre. Asimismo, Pacheco y Santos (2002) encontraron una disminución en la frecuencia de los EPC en la especie *Anguilla anguilla* expuesta a efluentes que contenían Benzo [a] pireno. Lo encontrado en la Figura 23b podría ser debido a que el Hg interfiere de forma no considerable con la proliferación de eritrocitos; Cavas (2008) afirma



que el acetato de plomo y el cloruro de mercurio, además de interferir con la proliferación de los eritrocitos, también inhibe la liberación de los EPC a la circulación sanguínea.

En hembras (Figura 24a) de *A. clypeata* se observó una correlación negativa aunque no significativa entre la frecuencia de EPC/10,000 y la relación H/L ( $r=-0.501$ ,  $P=0.0679$ ), y en el caso de los machos (Figura 24b) la correlación fue positiva aunque también no significativa ( $r=0.581$ ,  $P=0.227$ ). Tal vez otro agente diferente al Hg ( $r=-0.141$ ,  $P=0.63$ ) y Pb ( $r=0.333$ ,  $P=0.245$ ) provocó una pequeña disminución en la frecuencia de EPC, lo cual genera un ligero estrés en hembras de *A. clypeata*.

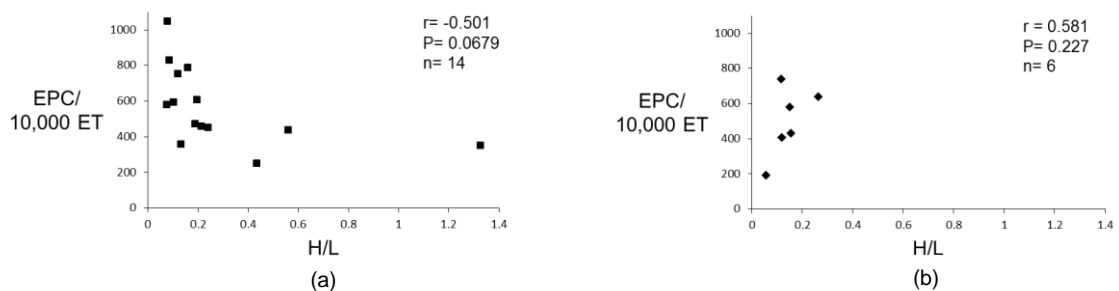


Figura 24. Relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos /10,000 eritrocitos totales (EPC/10,000 ET) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a)Hembras y (b)Machos de *A. clypeata*.

Al igual que la relación H/L, el IC también es un indicador del estado de salud de los animales (Schmitt y Dethloff, 2000; Vinkler et al; 2010). En hembras (Figura 25a) y en machos (Figura 25b) de *A. clypeata* se presentó una correlación negativa no significativa entre el IC y el índice H/L ( $r=-0.355$ ,  $P=0.162$  y  $r=-0.356$ ,  $P=0.347$ , respectivamente), mientras que en hembras (Figura 25c) y machos (Figura 25d) de *A. acuta* la correlación fue positiva no significativa ( $r=0.418$ ,  $P=0.35$  y  $r=0.357$ ,  $P=0.123$ , respectivamente).

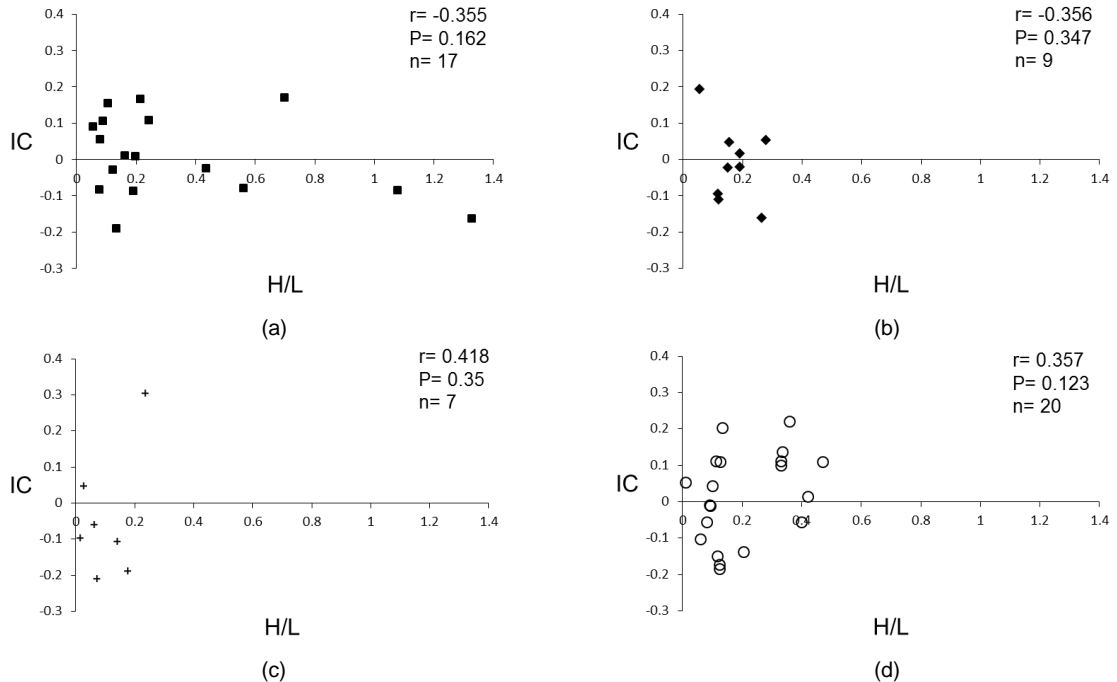


Figura 25. Relación entre el índice de condición (IC) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a) Hembras y (b) Machos de *A. clypeata*, y en (c) Hembras y (d) Machos *A. acuta*.

No sólo la presencia de contaminantes (Eisler, 1987; Scheuhammer, 1987) puede producir un efecto en el estado de salud de los individuos en los sistemas naturales. Otros factores que pueden influenciar estos índices son el tamaño corporal, la disponibilidad del alimento (Millar y Hickling, 1990), las interacciones sociales (Gross y Siegel, 1983), la edad, el sexo (Laiolo et al., 2009; Fairbrother y O'Loughlin, 1990) y las enfermedades (Work et al., 2001; Aguirre et al., 1995). Ots et al. (2001), inyectaron un antígeno no patógeno al herrerillo común (*Parus caeruleus*) mostrándose al final del desafío inmunológico un incremento en la relación H/L, y una pérdida en la masa corporal; esto sugiere que la relación H/L aumenta al mismo tiempo que se deteriora la condición corporal. Sin embargo, en las Figuras 25a, 25b, 25c y 25d no se observaron evidencias de que machos o hembras de *A. clypeata* y *A. acuta* estén comprometidos inmunológicamente.

En la Figura 26a se observó que las hembras de *A. acuta* tienen una correlación negativa no significativa ( $r=0.646$ ,  $P=0.117$ ) entre IC y la concentración de Hg,

mientras que en machos (Figura 26b) la correlación negativa sí fue significativa ( $r=-0.495$ ,  $P=0.0267$ ).

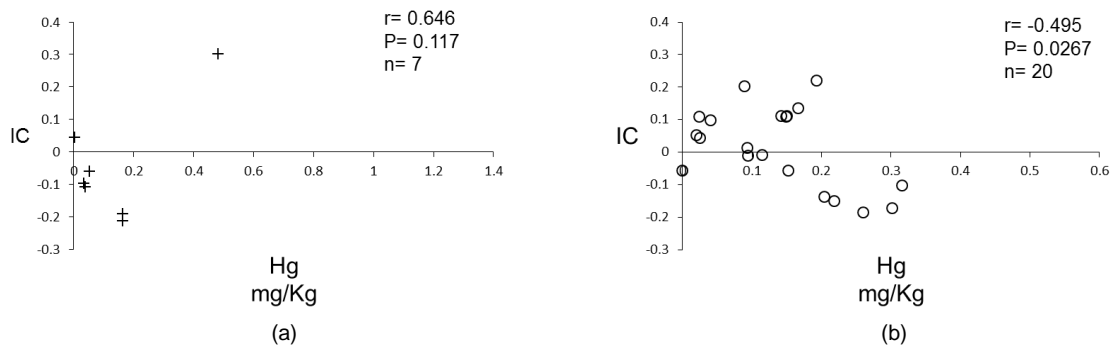


Figura 26. Relación entre el índice de condición (IC) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos de *A. acuta*.

El comportamiento de los datos en la Figura 26b podría deberse a que el Hg provocó una disminución del apetito en machos, tal y como lo indica Scheuhammer (1987), quien expone que el metilmercurio provoca la disminución del apetito y, por tanto, la pérdida de peso en las aves expuestas. Resultados similares al presente estudio fueron los encontrados en la especie *Somateria mollissima borealis*, en donde la masa corporal fue inversamente correlacionada con la concentración de Hg en plumas, debido a que el metilmercurio le provocó a los organismos una disminución del apetito (Spalding et al., 2000). Grasman y Scanlon (1995) mencionan que una mala condición corporal puede afectar a la salud de las aves debido al pobre éxito de forrajeo, lo que compromete al sistema inmune, y según Spalding et al. (2000) esta situación incrementa la susceptibilidad de las aves a enfermarse, lo que provoca altas mortalidades en los juveniles. Además, Wayland et al. (2002) mencionan que la relación inversa encontrada entre el peso corporal y la concentración de Hg en las aves silvestres como en la especie *Somateria mollissima borealis* puede ser resultado del aumento o la pérdida de peso, lo cual coincide con el momento en el que fueron muestreados los organismos, y no producto de los efectos del Hg.

En hembras (Figura 27a) de la especie *A. acuta* se dió una correlación positiva significativa entre la relación H/L y la concentración de Hg ( $r=0.8023$ ,  $P=0.03$ ), y

en machos (Figura 27b) no hubo una correlación significativa ( $r=-0.316$ ,  $P=0.175$ ). Sin embargo, la correlación significativa en las hembras se debe al punto más alto en el índice H/L y concentración de Hg, pueden existir datos intermedios, los cuales no se conocieron debido a las pocas hembras muestreadas, por lo que no se podría decir con certeza que el Hg provocó un estrés en las hembras de *A. acuta*.

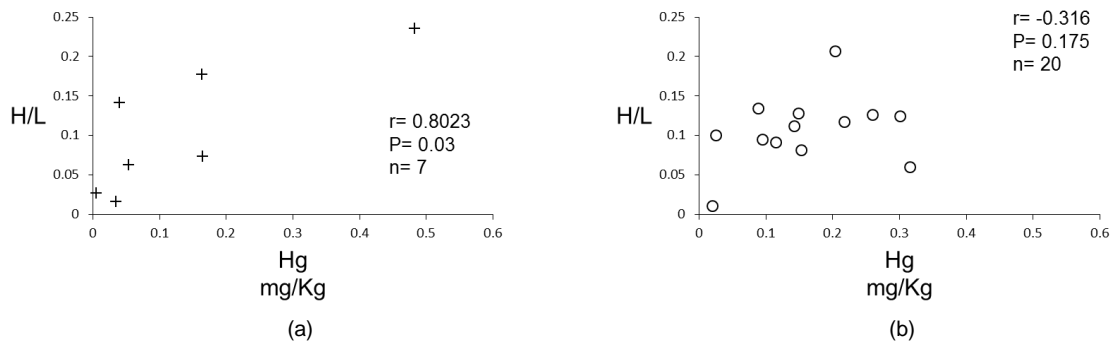


Figura 27. Relación entre la relación heterófilo/linfocito (H/L) y la concentración de Hg en (a)Hembras y (b)Machos *A. acuta*.

Blanco et al. (2004), midieron la condición corporal (masa corporal corregida por el tamaño), la relación H/L (como una medición indirecta del sistema inmune), y las concentraciones de cobre, Zn, Cd, Pb y As, en aves del nido de la especie *Milvus migrans* provenientes de una área donde estaban expuestas a las emisiones de un incinerador de residuos en España. Se encontró que las aves con bajos niveles de cobre y una pobre condición nutricional sufren más estrés debido a la contaminación por cadmio que las aves con mayores niveles de cobre. Además, Plautz et al. (2011) observaron que en las aves *Zenaidura macroura* que ingirieron más perdigones de Pb hubo una disminución de la supervivencia y un aumento en la relación H/L y, en otro estudio con esta misma especie realizado por Schulz et al. (2006), resultó que las aves que consumieron perdigones de Pb tuvieron mayor proporción de heterófilos que de linfocitos que las que no los consumieron.

Por lo anterior, se podría considerar que de existir datos intermedios en la Figura 27a habrían evidencias de que el Hg indujo estrés en hembras de *A. acuta*, tal vez incrementado los niveles de la corticosterona en el plasma, lo cual según Latimer y Bienzle (2010) induce heterofilia. Esta diferencia en la respuesta al estrés entre los sexos de *A. acuta* puede deberse a lo que mencionan Carere et al. (2005), que los individuos de una misma especie pueden diferir en sus respuestas de comportamiento al estrés o al miedo, e inclusive dentro del mismo sexo.

En peces, los índices organosomáticos son indicadores de salud que han sido usados en estudios sobre contaminantes (Schmitt y Dethloff, 2000), ya que tanto el factor de condición como los índices organosomáticos, son indicadores potenciales de los efectos tóxicos, al proporcionar información sobre la habilidad de un organismo para tolerar la contaminación química u otros tipos de estrés ambiental (Mayer et al., 1992 en van der Oost et al., 2003). Por su parte, los riñones son uno de los órganos en donde se distribuye el Hg, el Pb y el Cd en las anguilas (*Anguilla marmorata*) (Le et al., 2010), además, dicho órgano es el encargado de sintetizar metalotioneínas para la desintoxicación de metales (Smet et al., 2001).

Se observa que en hembras de *A. acuta* (Figura 28a) existe una correlación negativa significativa entre el IN y la concentración de Hg ( $r=-0.906$ ,  $P=0.0049$ ), y en machos (Figura 28b) la correlación es positiva entre estos dos biomarcadores ( $r=0.582$ ,  $P=0.00713$ ). Similar que en la Figura 27a, la correlación significativa en las hembras se debe al punto más alto en la concentración de Hg y más bajo en el IN. Pueden existir datos intermedios, los cuales no se conocieron debido a las pocas hembras muestreadas, por lo que no se podría decir con certeza que el Hg provocó disminución en el IN en las hembras de *A. acuta*.

De existir esos puntos intermedios sería evidente que la Figura 28a muestra que a la más alta concentración de Hg se presenta el menor valor del IN, lo que

podría indicar que este índice aumenta o disminuye según la concentración de Hg en el riñón.

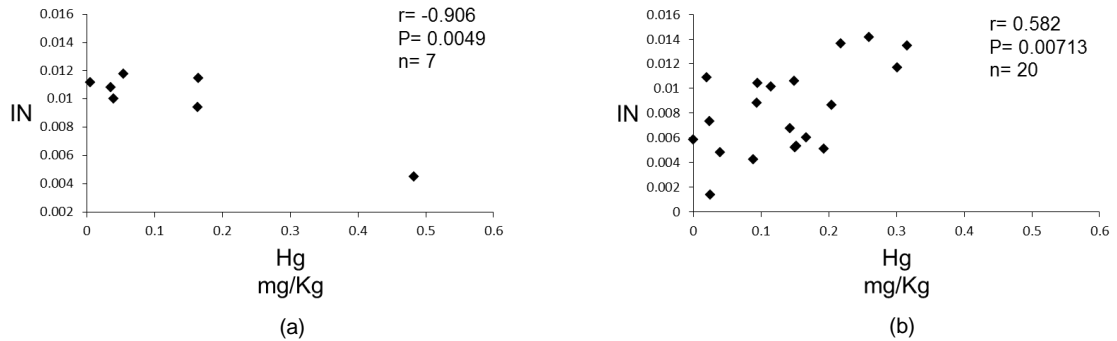


Figura 28. Relación entre el índice nefrosomático (IN) y la concentración de Hg en (a) Hembras y (b) Machos de *A. acuta*.

Algunos autores han encontrado aumento y disminución en la masa de los riñones cuando los organismos están expuestos a contaminantes, por ejemplo, Wayland et al. (2002) encontraron en la especie *Somateria mollissima borealis* que la masa del riñón estaba positivamente correlacionada con las concentraciones de Hg en hígado, en cambio Fox et al. (2007), observaron que en las gaviotas (*Larus argentatus*) que se encontraban en lugares muy contaminados, la masa del riñón había sido reducida. Los últimos autores sugieren que la disminución de la masa de los riñones es un síntoma que indica que este órgano ha sido dañado y que está funcionalmente comprometido; por otro lado, Knotek et al. (2002) exponen que la inflamación aguda de los riñones puede provocar una heterofilia.

Estudios realizados por Warui (1989) en diferentes especies de aves silvestres y de aves criadas en cautiverio mostraron que el volumen de los riñones aumentaba en proporción con el peso corporal, y que estos dos parámetros estaban fuertemente correlacionados, esto es contrario a lo que se encontró para el presente estudio, ya que en hembras (Figura 29a) de *A. clypeata* se observó una correlación negativa significativa entre el IC e IN ( $r = -0.695$ ,  $P = 0.00196$ ), mientras que en machos (Figura 29b) también se observó la misma

tendencia, aunque no de forma significativa ( $r=-0.508$ ,  $P=0.163$ ). Tanto en hembras (Figura 29c) como en machos (Figura 29d) de *A. acuta* también se mostró una correlación negativa significativa entre estos dos biomarcadores ( $r=-0.771$ ,  $P=0.0426$  y  $r=-0.655$ ,  $P=0.00173$ , respectivamente).

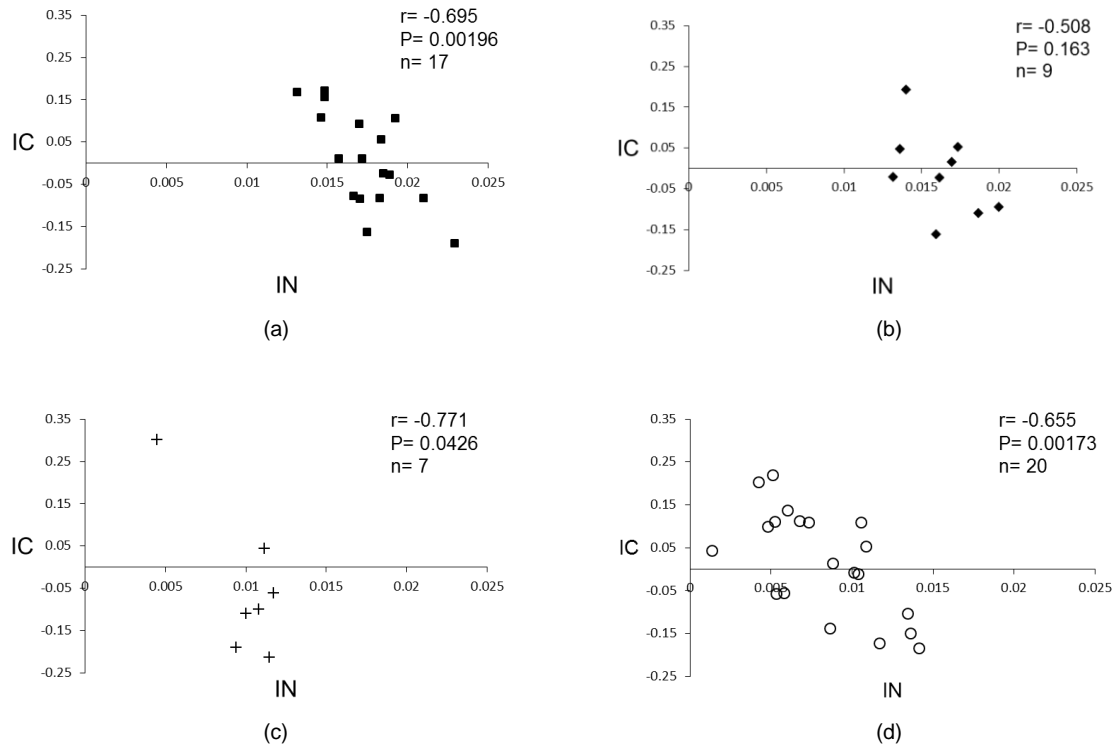


Figura 29. Relación entre el índice de condición (IC) y el índice nefrosomático (IN) en (a)Hembras y (b)Machos de *A. clypeata*, y en (c)Hembras y (d)Machos *A. acuta*.

La correlación observada en la Figura 29a podría ser provocada por otro contaminante diferente al Hg o Pb, ya que estos metales no estuvieron correlacionados significativamente con el IC ( $r=-0.275$ ,  $P=0.285$  y  $r=0.292$ ,  $P=0.255$ , respectivamente) e IN ( $r=-0.101$ ,  $P=0.699$  y  $r=-0.122$ ,  $P=0.641$ , respectivamente). De igual manera la correlación que se encontró en hembras de *A. acuta* (Ver Figura 29c) pudo haber sido provocada por otro contaminante diferente al Pb o al Hg, ya que este último metal mostró una correlación negativa significativa con el IN (Ver Figura 28a) y una correlación no significativa con el IC ( $r=0.646$ ,  $P=0.117$ ), y respecto al Pb una correlación no significativa con IN ( $r=0.555$ ,  $P=0.196$ ) y con IC ( $r=-0.0125$ ,  $P=0.979$ ). Parece que la correlación negativa significativa entre el IC y el IN en machos de *A. acuta*

(Figura 29d) fue generada por el Hg, ya que este metal pudiera estar provocando un aumento del riñón (Figura 28b) y una disminución del IC (Figura 26b).

Tanto en hembras como en machos (Figuras 30a y 30b, respectivamente) de *A. acuta* se observó una correlación negativa entre el IN y el índice H/L, sólo que en machos no es de forma significativa ( $r=-0.845$ ,  $P=0.0165$  y  $r=-0.398$ ,  $P=0.082$ , respectivamente). Los resultados encontrados en hembras de *A. acuta*, podrían indicar que la disminución del IN provocada por el Hg (Ver Figura 28a) les genera un estrés. Aunque esto solo sería válido, si en la mencionada figura existiera una correlación significativa, debido a que este comportamiento se pierde si se anula el valor más alto en el IN y en la concentración de Hg.

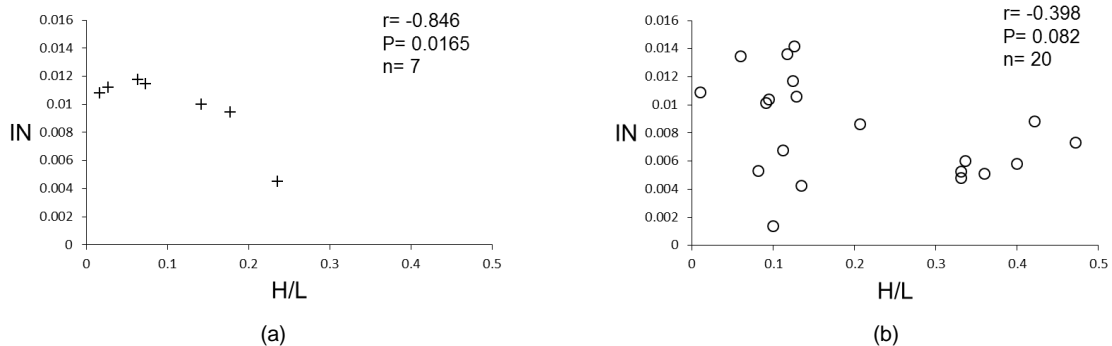


Figura 30. Relación entre el índice nefrosomático (IN) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en (a) Hembras y (b) Machos de *A. acuta*.

El hígado, al igual que el riñón es uno de los órganos en donde también se distribuye el Hg, el Pb y el Cd en la *Anguilla marmorata* (Le et al., 2010), y también uno de los principales órganos sintetizadores de metalotioneínas (Smet et al., 2001). En hembras (Figura 31a) de *A. acuta* se observó una correlación negativa no significativa entre el IH y la concentración de Hg ( $r=-0.68$ ,  $P=0.0926$ ), en cambio en machos (Figura 31b) ( $r=0.531$ ,  $P=0.0232$ ) la correlación fue positiva y significativa.



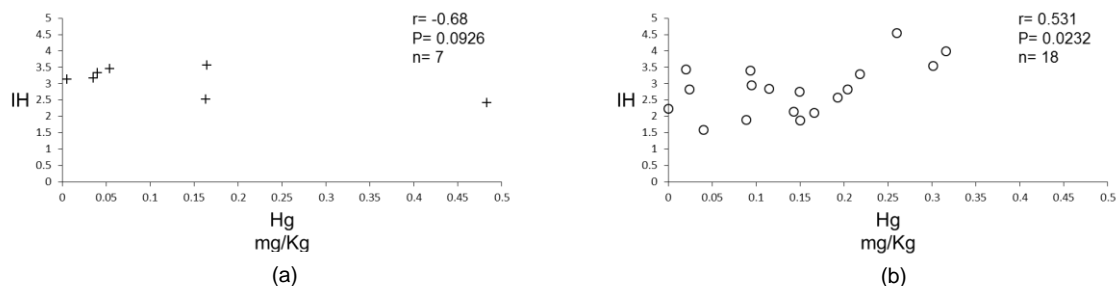


Figura 31. Relación entre el índice hepatosomático (IH) y la concentración de Hg en (a) Hembras y (b) Machos de *A. acuta*.

Posiblemente el hígado de los machos está agrandado para poder llevar a cabo los procesos de desintoxicación del Hg. En lugares contaminados por compuestos orgánicos tales como BPCs Lange et al. (1992) observaron altos IH y bajos IC en el pez de la especie *Limanda limanda*, estudios como éste y el de Kopecka-Pilarczyk y Correia (2009) demuestran que en los individuos que están expuestos a contaminantes ocurre un aumento de órganos; además, Whyte et al. (2000) en Kopecka-Pilarczyk y Correia (2009) indican que los peces con hígados agrandados pueden tener mayor capacidad para metabolizar los contaminantes acumulados.

En hembras (Figura 32a) ( $r=-0.541$ ,  $P=0.0371$ ) y machos (Figura 32b) ( $r=-0.839$ ,  $P=0.00921$ ) de *A. clypeata* se observó una correlación negativa significativa entre el IC y el IH. Tanto en hembras (Figura 32c) ( $r=-0.54$ ,  $P=0.211$ ) como en machos (Figura 32d) ( $r=-0.705$ ,  $P=0.00108$ ) de *A. acuta* también se observó una correlación negativa, sólo que en las hembras no es significativa. Parece que la correspondencia negativa significativa entre el IC y el IH en machos de *A. acuta* (Figura 32d) es provocada por el Hg, ya que este metal pudiera haber inducido un aumento del hígado en los machos de esta especie (Figura 31b) y una disminución del IC (Figura 26b). Las correlaciones dadas entre el IC e IH para ambos sexos de *A. clypeata* podría indicar que algún contaminante diferente al Hg ( $r=-0.275$ ,  $P=0.285$  para IC de hembras y,  $r=-0.121$ ,  $P=0.757$  para IC de machos,  $r=-0.0645$ ,  $P=0.819$  para IH de hembras y,  $r=0.388$ ,  $P=0.343$  IH de machos) o Pb ( $r=0.292$ ,  $P=0.255$  para IC de hembras y,  $r=0.165$ ,  $P=0.67$  para IC de machos,  $r=0.165$ ,  $P=0.557$  para IH de hembras y,  $r=-0.465$ ,  $P=0.246$  para IH de machos) provocó este comportamiento de los datos en las Figuras 32a y 32b.

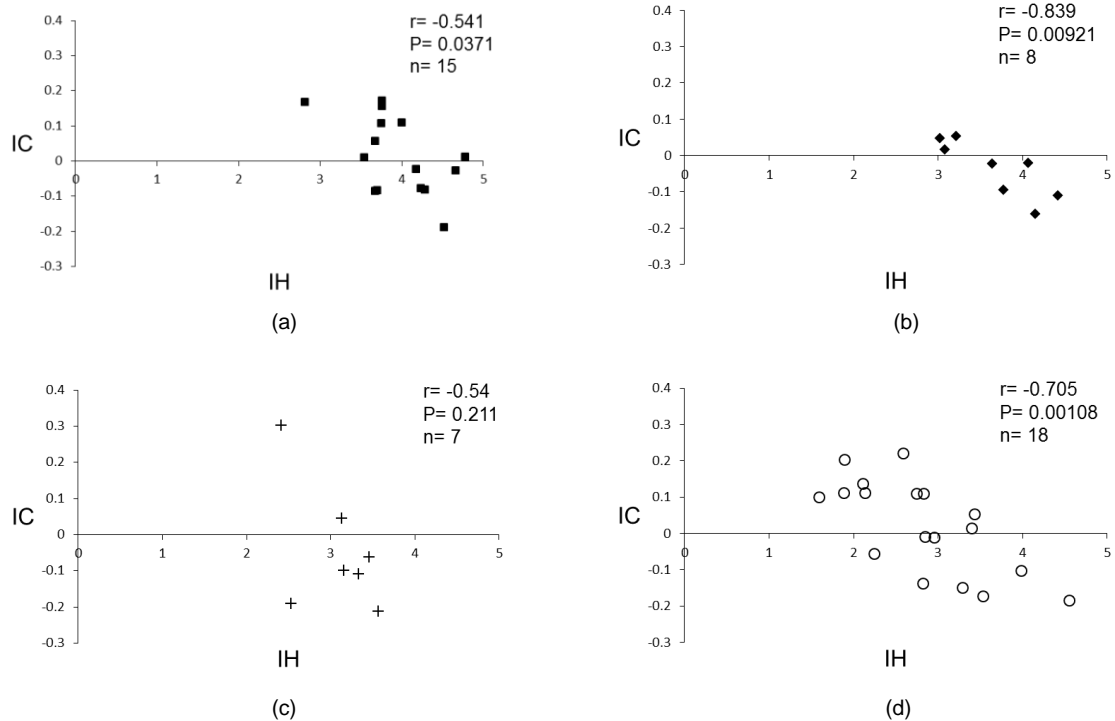


Figura 32. Relación entre el índice de condición (IC) y el índice hepatosomático (IH) en (a)Hembras y (b)Machos de la de *A. clypeata*, y en (c)Hembras y (d)Machos de *A. acuta*.

Resultados similares al presente estudio son los encontrados por Kopecka-Pilarczyk y Correira (2009), estos autores observaron que en peces *Sparus aurata* tratados con PAH se presentó una disminución del factor de condición y un aumento en el IH (ambos de manera no significativa). Los autores sugieren que estos resultados pueden indicar un aumento en las actividades de desintoxicación en respuesta a la presencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Pereira et al., 1993 en Kopecka-Pilarczyk y Correira, 2009) junto con el daño a la salud y a la condición fisiológica de los peces (Kopecka y Pempkowiak, 2008 en Kopecka-Pilarczyk y Correira, 2009). Por otro lado, Li et al. (2010) encontraron que los peces tratados con el fármaco carbamazepina se presentaba una disminución significativa del factor de condición, ya que este medicamento provocó un efecto metabólico y una disminución de las fuentes de energía, además también indujo un incremento en el IH aunque no de forma significativa, lo cual quiere decir que hubo un daño en el hígado pero no el suficiente para provocarle un envenenamiento.

En hembras (Figura 33a) de *A. clypeata* se observó una correlación positiva significativa entre el IB y la concentración de Pb ( $r=0.709$ ,  $P=0.00143$ ), y en machos (Figura 33b) la correlación no fue significativa ( $r=0.22$ ,  $P=0.57$ ). Esto puede deberse al aumento del bazo debido a la presencia de Pb, ya que según Le et al. (2010), el bazo es uno de los órganos donde algunos metales como Hg y Pb se acumulan, por otro lado John (1994) menciona que el bazo es el principal órgano del sistema inmune en las aves adultas, y que su aumento puede ser provocado por la presencia de células anormales, parásitos o toxinas en la sangre. Resultados similares a lo obtenido en este estudio son los encontrados por Wayland et al. (2002), quienes observaron que la masa del bazo fue positivamente correlacionada con las concentraciones de Hg en hígados de la especie *Somateria mollissima borealis*. Por otro lado, Pulsford et al. (1995) encontraron una reducción del IB en peces *Zosterisess orophiocephalus* provenientes del lugar más contaminado de los sitios muestreados en Porto Marghera, lo cual podría ser un indicador de estrés, ya que el bazo de los peces se contrae cuando se encuentra en lugares contaminados, y siendo el bazo el mayor sitio de almacenamiento de eritrocitos en peces, entonces los eritrocitos son forzados a almacenarse en la circulación.

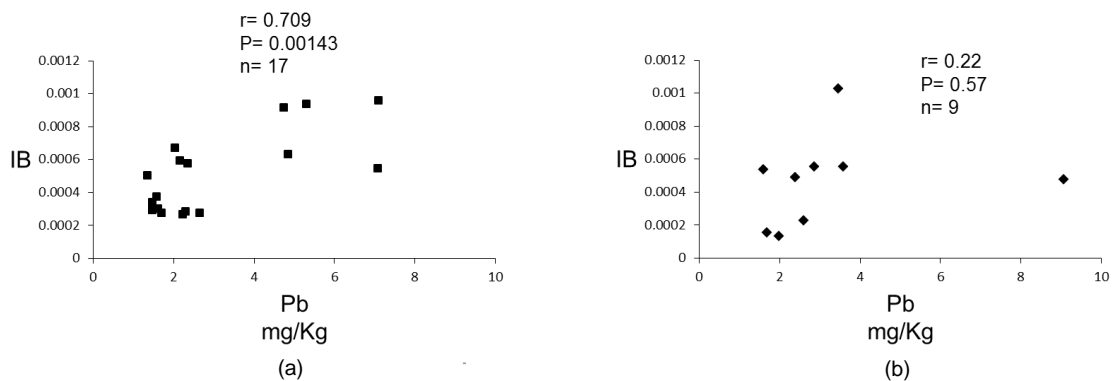


Figura 33. Relación entre el índice bazosomático (IB) y la concentración de Pb de *A. clypeata*.

En este trabajo, no sólo la presencia de contaminantes pudo haber provocado las correspondencias negativas que se observan entre el IC y los índices organosomáticos, sino también las razones podrían ser la nutrición, los efectos provocados por los patógenos (Dethloff y Schmitt, 2000) y la energía que invierten las aves para la migración.

### *Discusión general*

Las hembras en *A. clypeata* y los machos en *A. acuta* fueron los sexos que presentaron mayores correspondencias entre biomarcadores. Posiblemente son más susceptibles a contaminantes, independientemente de la concentración que tengan ambos sexos de cada especie, ya que según Burger et al. (2007) el género puede influir en la exposición si uno de los sexos permanece más tiempo en un lugar contaminado, o si es más susceptible a los contaminantes (Burger et al., 2007). El efecto de los contaminantes en función del género puede ocurrir desde el nivel molecular hasta el poblacional, como mutagénesis, expresión génica, alteraciones bioquímicas, morfológicas, de desarrollo, reproducción, patologías y comportamiento (Burger et al., 2007). Por ejemplo, en las hembras de los cetáceos, los organoclorados están correlacionados con la interrupción de la actividad de la oxidasa de función mixta, lo que trae como consecuencia el incremento de los niveles de contaminantes (Fossi et al., 2003).

*A. acuta* es la especie en la que se observaron mayores correspondencias entre biomarcadores; en hembras, entre EBC y H/L, IC e IN, y entre IN y H/L; y en machos, entre IC y Hg, IN y Hg, IC e IN, IH y Hg, y entre IC e IH. En cambio, las hembras de *A. clypeata* presentaron correspondencias entre EPCMN y EMN, BC y EMN, BC y EBC, IC e IN, y entre IB y Pb; y en machos, sólo entre IC e IH. En *A. acuta*, las correspondencias encontradas entre biomarcadores a nivel organismo podrían señalar efectos fisiológicos, lo cual tiene una mayor relevancia ecológica que a nivel celular o citogenético. Quizás *A. acuta* es menos eficiente para metabolizar los contaminantes, a pesar de que las

características de *A. clypeata* les hace tener mayor contacto con éstos. En este sentido, *A. clypeata* posee unas lamelas más espaciadas que otros patos, por lo que la tasa de filtración del agua y el consumo de invertebrados de los cuales se alimenta es mejor (Kooloos et al., 1989). Además, las especies silvestres son vulnerables a los contaminantes por causa de las diferentes formas de exposición, consumo y metabolismo (Burger et al., 2007), y es por causa de este último factor que entre especies existen diferencias en la habilidad para metabolizar contaminantes (Naso et al., 2003).

La frecuencia de los MN en *A. clypeata* y *A. acuta* son mayores a las reportadas para otros Anseriformes. En ambas especies, las anomalías nucleares no mostraron correspondencias significativas con Hg y Pb, por lo que pudiera ser que otros contaminantes las provocaron, o bien, son propias de las especies.

En el actual estudio se observó una variación en los IC estimados para ambas especies, siendo los organismos con menores IC los que tienen menos posibilidad de supervivencia que los que tienen un IC mayor (Millar y Hickling, 1990). Los valores bajos en el IC pueden deberse a la carencia del alimento durante la ruta de migración, la exposición a patógenos o a contaminantes ambientales, o bien es una condición normal debido al gasto energético durante la migración.

La concentración de Hg en plumas fue significativamente mayor en *A. clypeata* que en *A. acuta*, lo cual podría deberse a los hábitos alimenticios. A pesar de que ningún organismo muestreado presentó niveles de Hg iguales o mayores de 5 mg/Kg (concentración a la cual se han presentado efectos negativos en otras especies de aves) (Eisler, 1987); los organismos de *A. clypeata* fueron los que además de haber presentado significativamente mayores niveles de Hg, también tuvieron significativamente mayores IN, IH e IB, sin embargo, sólo los organismos de *A. acuta* mostraron una correlación significativa entre Hg e IC, IN e IH. En hembras de *A. acuta*, quizá el Hg provocó un aumento en la relación H/L y una disminución en el IN, pero esto es incierto debido a las pocas

hembras muestreadas y, en machos, posiblemente el Hg indujo una ligera disminución de EPC.

Respecto a la concentración de Pb en plumas, no hubo diferencias significativas entre especies, sin embargo, se presentaron mayores concentraciones en *A. acuta*, tal vez debido a que se alimenta de plantas que son hiperbioacumuladoras de Pb. Aunque el 15.38 % de los organismos de *A. clypeata* y el 29.16 % de los de *A. acuta* tienen una concentración de Pb por arriba de 4 mg/Kg, que es a la cual en otras especies de aves se han visto efectos negativos (Burger y Gochfeld, 2000), sólo en hembras de *A. clypeata* el Pb estuvo correlacionado significativamente con IB.

El peso corporal de los organismos muestreados no mostró una correlación positiva con la concentración de contaminantes. Respecto al Hg, esta situación podría deberse a que solamente fue muestreada una parte de la población de *A. clypeata* y *A. acuta*, por lo tanto no se conoce el verdadero comportamiento del Hg respecto al peso corporal. Otra causa sería que los especímenes no están siendo expuestos considerablemente al Hg.

Aunque de forma no significativa, en hembras de *A. clypeata* y en machos de *A. acuta* se observaron mayores valores en la relación H/L, el cual está relacionado con el estrés (Gross y Siegel, 1986), esta situación puede deberse a que este sexo responde ante una misma situación de manera diferente, lo cual significa que podría ser con un mayor estrés (Carere et al., 2005), o bien está más expuesto a contaminantes ambientales (Grasman y Scanlon, 1995). Esto último coincide con lo sucedido en hembras de *A. clypeata*, ya que este sexo presentó niveles más elevados de Pb, IN, IH, IB y H/L que los machos, aunque no significativamente.

## VIII. CONCLUSIONES

Comparando entre especies, la concentración de Hg en plumas de *A. clypeata* resultó significativamente mayor respecto a *A. acuta*.

Los resultados indican que en hembras de *A. clypeata* el Pb provocó afectación en el tamaño del bazo.

En machos de *A. acuta*, el Hg estaría afectando el riñón, hígado e índice de condición, además de estar posiblemente asociado a efectos citotóxicos.

La correlación entre Hg y los índices de condición biológica indica que *A. acuta* presenta un mayor nivel de afectación que *A. clypeata*.

Al mostrar *A. acuta* correlación de los índices de condición biológica con Hg, además de ser una especie abundante y de fácil colecta, se le podría considerar como un bioindicador de contaminación ambiental.

Respecto al género de una misma especie no hubo diferencias significativas en la concentración de Hg y Pb.

En *A. acuta* se observó que posiblemente el Hg le provocó mayores daños que los provocados por el Pb a *A. clypeata*. Quizás *A. acuta* es menos eficiente para metabolizar los contaminantes debido a que sus hábitos alimenticios lo hacen tener menos contacto con los contaminantes respecto a *A. clypeata*.

Las anomalías citogenéticas observadas en *A. clypeata* y en *A. acuta* no mostraron correlación con Hg o Pb.

De acuerdo a la frecuencia de los MN encontrados en *A. clypeata* y en *A. acuta*, dentro del género *Anas*, ambas especies podrían ser potencialmente consideradas como bioindicadoras de genotoxicidad.



## IX. RECOMENDACIONES

Incrementar el número de machos y hembras recolectados de *Anas clypeata* y *Anas acuta*, respectivamente.

Debido a que *Anas clypeata* y *Anas acuta* son especies migratorias, se recomienda complementar estos estudios con evaluación ecotoxicológica de especies que sean residentes, para identificar si hay factores ambientales en Marismas Nacionales que pudieran representar un riesgo para aves acuáticas.

## X. LITERATURA CITADA

- Aguayo-Hernandez, J. R. (1992). Analysis of the definitive statistics of the 11th General Population and Housing Census. *Emisor demografico* 6 (2): 21-24.
- Aguirre, A. A., Balazs, G. H., Spraker, T. R. y Gross, T. S. (1995). Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology*. 68 (5): 831-854.
- Alghazal, M. A., Šutiaková, I., Kovalkovičová, N., Legáth, J., Falis, M., Pistl, J., R Sabo, R., Beňová, K., Sabová, L. y Váczi, P. (2008). Induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate. *Toxicol Ind Health*. 24, 587-593.
- Austin, J. E. y Miller, M. R. (1995). Northern pintail (*Anas acuta*). A. Poole y F. Gill (Editores). En: *The birds of North America*. No. 163. The academy of natural sciences, Philadelphia; The american ornithologists union, Washington, D.C., 1-32 p.
- Baatrup, E. (1991). Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100C (1/2): 253-257.
- Baos, R., Jovani, R., Pastor, N., Tella, J. L., Jiménez, B., Gómez, G., González, Ma. J. e Hiraldo, F. (2006). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after mining accident. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25 (10): 2794-2803.
- Barron, M. G. (2003). Capítulo 32: Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms. En: David J. Hoffman, Barnett A. Rattner, G. Allen Burton, Jr. y John Cairns, Jr. (Editores). *Handbook of Ecotoxicology*. Segunda edición. Lewis Publishers, Washington, D.C. 877-892.
- Bastidas-Bonilla, C. (2010). Transferencia trófica de compuestos organoclorados (OCs) en el pez dorado *Coryphaena hippurus* de la costa del sur de Sinaloa. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

- Becker, P. H. (2003). Capítulo 19: Biomonitoring with birds. En: B. A. Markert, A. M. Breure y H. G. Zechmeister (Editores). *Bioindicators & Biomonitors*.
- Berlanga-Robles, C. A. y Ruiz-Luna, A. (2002). Land use mapping and change detection in the coastal zone of northwest Mexico using remote sensing techniques. *Journal of Coastal Research*. 18 (3): 514-522.
- Bickham, J. W. (1994). Capítulo 6: Genotoxic responses in blood detected by cytogenetic and cytometric assays. En: M. Cristina Fossi y Claudio Loenzio (Editores). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, United States of America, 147-157 p.
- Blanco, G., Jiménez, B., Frías, O., Millan, J. y Dávila, J. A. (2004). Contamination with nonessential metals from a solid-waste incinerator correlates with nutritional and immunological stress in pre fledgling black kites (*Milvus migrans*). *Environmental Research*. 94, 94-101.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M. y Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*. 78S, S93-S98.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Böhm, K. J., Prots, I., Unger, E., Thier, R., Bolt, H. M. y Degen, G. H. (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of Toxicology*. 78, 575-583.
- Bortolotti, G. R. (2010). Flaws and pitfalls in the chemical analysis of feathers: bad news-good news for avian chemoecology and toxicology. *Ecological Applications*. 20 (6): 1766-1774.
- Braune, B. M. and Gaskin, D. E. (1987a). A mercury budget for the bonaparte's gull during autumn moult. *Ornis Scandinavica*. 18, 244-250.
- Braune, B. M. and Gaskin, D. E. (1987b). Mercury Levels in bonaparte's gulls (*Larus philadelphia*) during autumn molt in the Quoddy Region, New Brunswick, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 16, 539-549.
- Braune, B. M., Donaldson, G. M. y Hobson, K. A. (2001). Contaminant residues in seabird eggs from the Canadian Arctic. Part I. Temporal trends 1975-1998. *Environmental Pollution*. 114, 39-54.
- Braune, B. M., Donaldson, G. M. y Hobson, K. A. (2002). Contaminant residues in seabirds eggs from the Canadian Arctic. II. Spatial trends and evidence from stable isotopes for intercolony differences. *Environmental Pollution*. 117, 133-145.

- Braune, B. M. y Malone, B. J. (2006). Organochlorines and mercury in waterfowl harvested in Canada. *Environmental Monitoring and Assessment*. 114, 331-359.
- Braune, B. M., Outridge, P. M., Fisk, A. T., Muir, D. C. G., Helm, P. A., Hobbs, K., Hoekstra, P. F., Kuzyk, Z. A. Kwan, M., Letcher, R. J., Lockhart, W. L., Norstrom, R. J., Stern, G. A. y Stirling, I. (2005). Persisten organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*. 351-352, 4-56.
- Brunström, B., Axelsson, J. y Halldin, K. (2003). Effects of endocrine modulators on sex differentiation in Birds. *Ecotoxicology*. 12, 287-295.
- Bryan, G. W. y Langston, J. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental Pollution*. 76, 89-131.
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P. y Orlando, E. F. (2007). Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research*. 104, 135-152.
- Burger, J. y Gochfeld, M. (2000). Effects of lead on birds (laridae): a review of laboratory and field studies. *Journal of Toxicology y Environmental Health*. Part B (3): 59-78.
- Campbell, T. W. (2010). Capítulo 123: Hematology of Psittacines. En: Douglas J. Weiss y K. Jane Wardrop (Editores). *Schalm's Veterinary Hematology*. Sexta edición. Wiley-Blackwell, USA, 968-976 p.
- Campo, J. L. y Davila, S. G. (2002). Estimation of heritability for heterophil:lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood. Effects of age, sex, and crossing. *Poultry Science*. 81, 1448-1453.
- Carere, C., Drent, P. J. y Privitera, L. (2005). Personalities in great tits, *Parus major*: stability and consistency. *Animal Behaviour*. 70, 795-805.
- Cavas, T. (2008). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 352-358.
- CEM Corp. (2001a). HP-500 Plus vessel accessory sets and autovent options. Instructions for use.
- CEM Corp. (2001b). Microwave accelerated reaction system for extraction. Operation Manual.

- Chappell, M.A., Savard, J. F., Siani, J., Coleman, S. w., Keagy J. y Borgia, G. (2011). Aerobic capacity in wild satin bowerbirds: repeatability and effects of age, sex and condition. *The Journal of Experimental Biology*. 214, 3186-3196.
- Cheraghi, M., Lorestani, B. y Yousefi, N. (2011). Introduction of hyperaccumulator plants with phytoremediation potential of a lead-zinc mine in Iran. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 77. 163-168.
- Clarkson, T. W. (2002). Capítulo 13: Mercury. En: Bibudhendra Sarkar (Editor). *Heavy Metals in the environment*. Editorial Marcel Dekker, Inc. United States of America. 457-501 p.
- Clarkson, T. W., Ph.D., Laszlo Magos, M.D., y Gary J. Myers, M.D. (2003). The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*. 349, 1731-1737.
- Conabio. (2011). La red de conocimiento sobre las aves de México. Ver: <http://avesmx.conabio.gob.mx>.
- CONANP. (2008). Estudio previo justificativo para el establecimiento del área natural protegida. Reserva de la biosfera Marismas Nacionales Sinaloa. SEMARNAT.
- Day, R. D., Keller, J. M., Harms, C. A., Segars, A. L., Cluse, W. M., Godfrey, M. H., Lee, A. M., Peden-Adams, M., Thorvalson, K., Dodd, M. y Norton, T. (2010). Comparison of mercury burdens in chronically debilitated and healthy loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Wildlife Diseases*. 46 (1): 111-117.
- Day, R. D., Segars, A. L., Arendt, M. D., Lee, A. M. y Peden-Adams, M. M. (2007). Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environmental Health Perspectives*. 115 (10): 1421-1428.
- Del Río-Zaragoza, O., Hernández-Rodríguez, M. y Bücle-Ramírez, L. F. (2008). Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41 (2): 135-145.
- Deng, H., Zhang, Z., Chang, C. y Wang, Y. (2007). Trace metal concentration in great tit (*Parus major*) and greenfinch (*Carduelis sinica*) at the Western Mountains of Beijing, China. *Environmental Pollution*. 148, 620-626.
- Depledge, M. H. (1994). Capítulo 12: The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. En: M. Cristina Fossi y Claudio

- Loenzio (Editores). Nondestructive biomarkers in vertebrates. Editorial Lewis Publishers. United States of America. 271-295.
- Dethloff, G. M. y Schmitt, C. J. (2000). Condition factor and organosomatic indices. En: Christopher J. Schmitt y Gail M. Dethloff (Editores). Biomonitoring of environmental status and trends (BEST) program: Selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Science for a changing world. 13-18 p.
- Di Giulio, R. T. y Scanlon, P. F. (1984). Heavy metals in tissues of waterfowl from the Chesapeake Bay, USA. Environmental Pollution. 35, 29-48.
- DiGangi, J. y Petrlík, J. (2005). The egg report. "Keep the promise, eliminate POPs!" Campaign and dioxin, PCBs and waste working group of the international POPs elimination network (IPEN) report. 1-49.
- Dubowy, P. J. (1985). Feeding ecology and behavior of postbreeding male blue-winged teal and northern shovelers. Canadian Journal of Zoology. 63, 1292-1297.
- Dubowy, P. J. (1996). Northern shoveler (*Anas clypeata*). En: A. Poole y F. Gill (Editores). The birds of North America. No. 217. The academy of natural sciences, Philadelphia; The america ornithologists union, Washington, D. C. 1 - 24 p.
- Edens, F. W. y Garlich, J. D. (1983). Lead-induced egg production decrease in leghorn and japanese quail hens. Poultry Science. 62 (9): 1757-1763.
- Eisler, R. (1987). Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Contaminant hazard Reviews 1-35. U. S. Fish and wildlife service patuxent wildlife research center. 1-63.
- EPA. (1982). Method 245.5. Methods for chemical analysis of water and wastes, EPA-600/4-82-055.
- EPA. (1986). Method 7471. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique).
- EPA. (1996). Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.
- EPA. (2007). Method 3545A. Pressurized fluid extraction (PFE).
- Evers, D. C., Burgess, N. M., Champoux, L., Hoskins, B., Major, A., Goodale, W. M., Taylor, R. J., Poppenga, R. y Daigle, T. (2005). Patterns and interpretation of mercury exposure in freshwater avian communities in northeastern North America. Ecotoxicology. 14, 193-221.

- Fairbrother, A. y O'Loughlin, D. (1990). Differential white blood cell values of the mallard (*Anas platyrhynchos*) across different ages and reproductive states. *Journal of Wildlife Diseases*. 26 (1): 78-82.
- Fairbrother, A., Fix, M., O'Hara, T. y Ribic, C. A. (1994). Impairment of growth and immune function of avocet chicks from sites with elevated selenium, arsenic, and boron. *Journal of Wildlife Diseases*. 30 (2): 222-233.
- Farrington, J. W. (1991). Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environmental Health Perspectives*. 90, 75-84.
- Farrington, J. W., Goldber, E. D., Risebrough, R. W., Martin, J. H. y Bowen, V. T. (1983). U. S. "Mussel Watch" 1976-1978: An overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. *Environmental Science and Technology*. 17, 490-496.
- Fernández, G., Warnock, N., Lank, D. B. y Buchanan, J. B. (2006). Conservation plan for the western sandpiper. Versión 1.0. Western Hemisphere Shorebird Reserve Network. 1-44.
- Flores-Verdugo, F. J., González-Farias, F., Blanco-Correa, M. y Nuñez-Pastén, A. (1997). The Teacapán-Agua-Brava. Marismas Nacionales mangrove ecosystem, Pacific coast of Mexico: and ecological and anthropogenic activities profile. En: Björn Kjerfve, Luiz Drude de Lacerda, El Hadji Salif Diop (Editores). *Mangrove Ecosystem studies in Latin America and Africa*. UNESCO New Delhi. 35-46 p.
- Fossi, M. C., Marsili, L., Neri, G., Natoli, A., Politi, E. y Panigada, S. (2003). The use of a non-lethal tool for evaluating toxicological hazard of organochlorine contaminants in mediterranean cetaceans: new data 10 years after the first paper published in MPB. *Marine Pollution Bulletin*. 46, 972-982.
- Fournier, M. A. y Hines, E. H. (1994). Effects of starvation on muscle and organ mass of king eiders *Somateria spectabilis* and the ecological and management implications. *Wildfowl*. 45, 188-197.
- Fox, A. G., Grasman, K. A. y Campbell, G. D. (2007). Health of herring gulls (*Larus argentatus*) in relation to breeding location in the early 1990s. II. Cellular and histopathological measures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70: 1471-1491.
- Franson, J. C., Hansen, S. P. y Schulz, J. H. (2009). Ingested shot and tissue lead concentrations in mourning doves. En: R. T. Watson, M. Fuller, M. Pokras, y W. G. Hunt (Editores). *Ingestion of lead from spent ammunition:*

- Implications for wildlife and humans. The Peregrine Fund, Boise. 175-186 p.
- Friend, M. (1989). Capítulo: 13.2.6. Lead Poisoning: The Invisible Disease Waterfowl management handbook. U.S. Fish and Wildlife Service National Wildlife Health Research Center. Madison, 1-5 p.
- Friend, M. (1999). Wildlife disease and zoonotics. Other Publications in zoonotics and wildlife disease. Chemical Toxins (Field manual of wildlife diseases). Universidad de Nebraska-Lincoln. 282-353.
- Friend, M. y Trainer, D. O. (1970). Polychlorinated biphenyl: Interaction with duck hepatitis virus. *Science*. 170 (3964): 1314-1316.
- Fu, G., Allen, H. E. y Cao, Y. (1992). The importance of humic acids to proton and cadmium binding in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11 (10): 1363-1372.
- Furness, R. W., Muirhead, S. J. y Woodburn, M. (1986). *Marine Pollution Bulletin*. 17 (1): 27-30.
- Galindo-Reyes, J. G. (2000). Condiciones ambientales y de contaminación en los ecosistemas costeros. SEMARNAP–Universidad Autónoma de Sinaloa. 149.
- Galindo-Reyes, J. G., Guerrero-Ibarra, M. A., Villagrana-Lizárraga, G., Quesada-Urenda, L. G. y Angulo-Escalante, S. (1992). Contaminación por plaguicidas en agua, sedimentos, camarón y almeja de dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. *Journal of Tropical Ecology*. 33, 172-180.
- García-Hernández, J., Cadena-Cárdenas, L., Betancour-Lozano, M., García de la Parra, L. M., García-Rico, L. y Márquez-Farías, F. (2007). Total mercury content found in edible tissues of top predator fish from the Gulf of California, Mexico. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 89 (3): 507-522.
- Gewurtz, S. B, Lazar, R. y Haffner, G. D. (2000). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon y polychlorinated biphenyl dynamics in benthic invertebrates of Lake Erie, USA. *Environmental Toxicology y Chemistry*. 19 (12): 2943-2950.
- Giesy, J. P., Feyk, L. A., Jones, P. D., Kannan, K. y Sanderson, T. (2003). Review of the effects of endocrine-disrupting chemicals in birds. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (11-12): 2287-2303.



- Gob. (2005). Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Ver en: [http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM\\_sinaloa](http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_sinaloa)
- Gómez-Meda, B. C., Zamora-Perez, A. L., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Ramos-Ibarra, M. L., Torres-Bugarín, O., Batista-González, C. M. y Zúñiga-González, G. M. (2006). Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology*. 35 (3): 206-210.
- Goutner, V., Furness, R. W. y Papakostas, G. (2007). Mercury in feathers of squacco heron (*Ardeola ralloides*) chicks in relation to age, hatching order, growth, and sampling dates. *Environmental Pollution*. 111, 107-115.
- Goyer, R. A. (1985). Urinary system. En: N. K. Mottet (Editor). *Environmental pathology*. Oxford University Press. New York. 290-319 p.
- Grasman, K. A. (2002). Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integrative And Comparative Biology*. 42, 34-42.
- Grasman, K. A. y Scanlon, P. F. (1995). Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in japanese quail. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 28 (2): 161-167.
- Grasman, K. A., Scanlon, P. F. y Fox, G. A. (1998). Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of The Great Lakes: A review of historical trends. *Environmental Monitoring and Assessment* 53, 117-145.
- Gross, W. B. y Siege, H. S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymfocyte ratio as measure of stress in chickens. *Avian Diseases*. 7 (4): 972-979.
- Gross, W. B. y Siegel, P. B. (1986). Effects of initial and second periods of fasting on heterophil/lymphocyte ratios and body weight. *Avian Diseases*. 30, 345-346.
- Guillemain, M., Devineau, O., Legretton, J., Mondain-Monval, J., Johnson, A. R. y Simon, G. (2007). Lead shot and teal (*Anas crecca*) in the Camargue, Southern France: Effects of embedded and ingested pellets on survival. *Biological Conservation*. 137, 567-576.
- Hall, B. D., Baron, L. A. y Somers, C. M. (2009). Mercury concentrations in surface water and harvested waterfowl from the Prairie Pothole region of Saskatchewan. *Environmental Sciences & Technology*. 43, 8759-8766.

- Hall, B. D., Bodaly, R. A., Fudge, R. J. P., Rudd, J. W. M. y Rosenberg, D. M. (1997). Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water, Air, and Soil Pollution*. 100, 13-24.
- Hamel, A., Mergler, D., Takser, L., Simoneau, L. y Lafond, J. (2003). Effects of low concentrations of organochlorine compounds in women on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblast. *Toxicological Sciences*. 76, 182-189.
- Hang, H., Wu, H., Wu, Y., Zhang, J. y Wang, W. (2011). Heavy metal concentrations in nestlings of black-crowned night herons (*Nycticorax nycticorax*) in Zhengzhou, China. 978-981.
- Haukos, D. A., Miller, M. R., Orthmeyer, D. L., Takekawa, J. Y., Fleskes, J. P., Casazza, M. L., Perry, W. M. y Moon, J. A (2006). Spring migration of northern pintails from Texas and New Mexico, USA. *Waterbirds*. 29 (2): 127-241.
- Hayashi, M., Sofuni, T. y Jr, M. I. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*. 120, 241-247.
- Heinz, G. H. y Hoffman, D. J. (2003). Embryotoxic thresholds of mercury: Estimates from Individual mallard eggs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44, 257-264.
- Henderson, L., Albertini, S. y Aardema, M. (2000). Thresholds in genotoxicity responses. *Mutation Research*. 464, 123-128.
- Hill, N. J., Takekawa, J. Y., Cardona, C. J., Ackerman, J. T., Schultz, A. K., Spragens, K. A. y Boyce, W. M. (2010). Waterfowl ecology and avian influenza in California: Do host traits inform us about viral occurrence? *Avian Diseases*. 54, 426-432.
- Hinck, J. E., Blazer, V. S., Denslow, N. D., Myers, M. S., Gross, T. S. y Tillitt, D. E. (2007). Biomarkers of contaminant exposure in northern pike (*Esox lucius*) from the Yukon River Basin, Alaska. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 52, 549-562.
- Hoffman, D. J., Franson, J. C., Pattee, O. H., Bunck, C. M. y Anderson, A. (1985). Survival, growth, and accumulation of ingested lead in nestling american kestrels (*Falco sparverius*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 14 (1): 89-94.
- Hylander, L. D. y Meili, M. (2003). 500 years of mercury production: Global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *The Science of the Total Environment*. 304, 13-27.

INEGI (2005). Ver en: <http://www.inegi.gob.mx/>

Jordanova, M., Rebok, K., Miteva, N. y Rocha, E. (2006). Evaluating pigmented macrophages as biomarkers for fish health and environmental pollution: evidence of natural seasonal fluctuations in Ohrid trout (*Salmo letnica* Kar). 1-7.

Jagoe, C. H., Bryan, A. L., Brant, H. A., Murphy, T. M. y Brisbin, I. L. (2002). Mercury in bald eagle nestlings from South Carolina, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 38 (4): 706-712.

Jaspers, V. L. B., Voorspoels, S., Covaci, A. y Eens, M. (2006). Can predatory bird feathers be used a non-destructive biomonitoring tool of organic pollutants? *Biology Letters*. 2, 283-285.

Jayasinghe, R., Tsuji, L. J. S., Gough, W. A., Karagatzides, J. D., Perera, D. y Nieboer, E. (2004). Determining the background levels of bismuth in tissues of wild game birds: a first step in addressing the environmental consequences of using bismuth shotshells. *Environmental Pollution*. 132, 13-20.

John, J. L. (1994). The avian spleen: A neglected organ. *The Quaterly Review of Biology*. 69 (3): 327-351.

Jordanova, M., Rebok, K., Miteva, N. y Rocha, E. (2006). Evaluating pigmented macrophages as biomarkers for fish health and environmental pollution: evidence of natural seasonal fluctuations in Ohrid trout (*Salmo letnica* Kar). 1-7.

Kahle, S. y Becker, H. (1999). Bird blood as bioindicator for mercury in the environment. *Chemosphere*. 39 (14): 2451-2457.

Keller, J. M., Peden-Adams, M. M. y Aguirre, A. A. (2005). Capítulo 8: Immunotoxicology and implications for reptilian health. En: Susan C. Gardner y Eva Oberdörster (Editores). *Toxicology of Reptiles*. Editorial: Tylor & Francis, Group. United States of América. 199-240 p.

Kendall, R. J. y Scanlon, P. F. (1981). Effects of chronic lead ingestion on reproductive characteristics of ringed turtle doves *Streptopelia risoria* and on tissue lead concentrations of adults and their progeny. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*. 26, (3), 203-213.

Klobucar, G. I. V., Pavlica, M., Erben, R. y Papes, D. (2003). Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*. 64, 15-23.

- Kluwe, W. M. (1981). Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 57 (3): 414-424.
- Knotek, Z., Hauptman, K., Knotkova, Z., Hajkova, P. y Tichy, F. (2002). Renal disease haemogram and plasma biochemistry in green iguana. *Acta Veterinaria Brno*. 71, 333-340.
- Kojadinovic, J., Bustamante, P., Churlaud, C., Cosson, R. P. y Corre, M. L. (2007). Mercury in seabird feathers: Insight on dietary habits and evidence for exposure levels in the Western Indian Ocean. 384, 194-204.
- Kooloos, J. G. M., Kraaijeveld, A. R., Langenbach, G. E. J. y Zweers, G. A. (1989). Comparative mechanics for filter feeding in *Anas platyrhynchos*, *Anas clypeata* y *Aythya fuligula* (Aves, Anseriformes). *Zoomorphology*. 108, 269-290.
- Kopecka-Pilarczyk, J. y Correia, A. D. (2009). Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 1296-1302.
- Korschgen, C. E. (1977). Breeding stress of female eiders in Maine. *Journal of Wildlife Management*. 41(3): 360-373.
- Kovacs, J. M., King, J. M. L., Flores de Santiago, F. y Flores-Verdugo, F. (2009). Evaluating the condition of a mangrove forest of the Mexican Pacific based on an estimated leaf area index mapping approach. *Environmental Monitoring Assessment*. 157 (3): 137-149.
- Kovacs, J. M., Malczewski, J. y Flores-Verdugo, F. (2004). Examining local ecological knowledge of hurricane Impacts in a mangrove forest using an analytical hierarchy process (AHP) approach. *Journal of Coastal Research*. 20 (3): 792-800.
- Krapu, G. L. (1974). Feeding ecology of pintail hens during reproduction. *The Auk*. 91, 278-290.
- Kunisue, T., Watanabe, M., Subramanian, A., Sethuraman, A., Titenko, A. M., Qui, V., Prudente, M. y Tanabe, S. (2003). Accumulation features of persistent organochlorines in resident and migratory birds from Asia. *Environmental Pollution*. 125, 157-172.
- Kursa, M., Afanasieva, K., Rushkovsky S., Barchuk R., Varenyuk I., Blyuma, O. y Bezrukov, V. (2005): Cytogenetic parameters of the bird genome instability in the ecological-genetic monitoring. *Problems of Nuclear Power Plants' Safety and of Chernobyl* 3(2): 92-96 (in Russian).

- Kushlan, J. A. (1993). Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colonial Waterbirds*. 16 (2): 223-251.
- Landers, D. H., Simonich, S. L., Jaffe, D. A., Geiser, L. H., Campbell, D. H., Schwindt, A. R., Schreck, C. B., Kent, M. L., Hafner, W. D., Taylor, H. E., Hageman, K. J., Usenko, S., Ackerman, L. K., Schrlau, J. E., Rose, N. L., Blett, T. F. y Erway, M. M. (2008). The fate, transport, and ecological impacts of airborne contaminants in Western National Parks (USA), Volume 1: U. S. Environmental Protection Agency Report EPA/600/R-07/138. 348 p.
- Lange, U. L., Grymlast, J. J., Siegers, D. y Karbe, L. (1992). Ethoxyresorufin o-deethylase and cytochrome P450 in the liver of dab (*Limanda limanda* (L.)) from the central and southern North Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 24 (9): 446-451.
- Laoilo, P., Banda, E., Lemus, J. A., Aguirre, J. I. y Blanco, G. (2009). Behaviour and stress response during capture and handling of the red-billed chough *Pyrhacorax pyrhacorax* (Aves: Corvidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 96, 846-855.
- Latimer, K. S. y Bienzle, D. (2010). Capítulo 50: Determination and Interpretation of the avian leukogram. En: Douglas J. Weiss y K. Jane Wardrop (Editores). *Schalm's Veterinary hematology*. Sexta edición. Wiley-Blackwell, USA, 345-357 p.
- Le, D. H., Nguyen, D. C., Harino, H., Kakutani, N., Chino, N. y Arai, T. (2010). Distribution of trace metals and methylmercury in soft tissues of the freshwater eel *anguilla marmorata* in Vietnam. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 59:282-290.
- Leche, R. (2008). Ver en: [http://www.fluidr.com/photos/rick\\_leche/interesting](http://www.fluidr.com/photos/rick_leche/interesting)
- León-Valdez, A. L. (2009). Evaluación de la condición ecológica de Marismas Nacionales, Nayarit, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Li, Z., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J. y Randak T. (2010). Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. *Journal Applied Toxicology*. 30, 197-203.
- Lidsky, T. I. y Schneider, J. S. (2003). Review article lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. 126, 5-19.
- Lucia, M., André, J. M., Gontier, K., Diot, N., Veiga, J. y Davail, S. (2010). Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, luminium,

nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the Southwest Atlantic coast of France. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 844-853.

- Lundholm, C. E. (1995). Effects of methyl mercury at different dose regimes on eggshell formation and some biochemical characteristics of the eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comparative Biochemistry Physiology*. 110C (1): 23-28.
- Maluf, S. W., Passos, D. F., Bacelar, A., Speit, G. y Erdtmann, B. (2001). Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38, 311-315.
- Marsili, L. y Focardi, S. (1996). Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of fin whales (*Balaenoptera physalus*) and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean sea. *Environmental Pollution*. 91 (1): 1-9.
- McMaster, M. E., Van Der Kraak, G. J., Portt, C. B., Munkittrick, K. R., Sibley, P. K., Smith, I. R. y Dixon, D. G. (1991). Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*. 21, 199-218.
- Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E. y Oliveira-Ribeiro, C. A. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68, 426-435.
- Millar, J. S. y Hickling, G. J. (1990). Fasting endurance and the evolution of mammalian body size. *Functional Ecology*. 4, 5-12.
- Miller, M. R. (1983). Foraging dives by post-breeding northern pintails. *The Wilson Bulletin*. 95 (2): 294-296.
- Miller, M. R., Takekawa, J. Y., Battaglia, D. S., Golightly, R. T. y Perry, W. M. (2010). Spring migration and summer destinations of northern pintails from the coast of southern California. *The Southwestern Naturalist*. 55 (4): 501-509.
- Mitchelmore, C. L. y Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*. 399, 135-147.

- Monteiro, L. R. y Lopes, H. D. (1990). Mercury content of swordfish, *Xiphias gladius*, in relation to length, weight, age, and sex. *Marine Pollution Bulletin*. 21 (6): 293-296.
- Moon, J. A. y Haukos, D. A. (2009). Factors affecting body condition of northern pintails wintering in the Playa Lakes Region. *Waterbirds*. 32 (1): 87-95.
- Mora, M. A., Musquiz, D., Bickham, J. W., Mackenzie, D. S., Hooper, M. J., Szabo, J. K. y Matson, C. W. (2006). Biomarkers of exposure and effects of environmental contaminants on swallows nesting along the Rio Grande, Texas, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25 (6): 1574-1584.
- Naso, B., Perrone, D. Ferrante, M. C., Zaccaroni, A. y Lucisano, A. (2003). Persistent organochlorine pollutants in liver of birds of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. *Archives of Environmental Contamination. Toxicol.* 45, 407-414.
- Novillo, A., Kitana, N., Marquez, E. y Callard, I. P. (2005). Capítulo 9: Reptilian genotoxicity. En: Susan C. Gardner y Eva Oberdörster (Editores). *Toxicology of Reptiles*. Editorial Tylor & Francis, Group. United States of América. 241-265 p.
- O'Connor, D. V. y Fromm, P. O. (1975). The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*. 13 (4): 406-411.
- Ochoa-Acuña, H., Sepúlveda, M. S. y Gross, T. S. (2002). Mercury in feathers from birds of the southeastern pacific: Influence of location and taxonomic affiliation. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 340-349.
- Ochoa-Acuna, H., Sepúlveda, M. S., Gross, T. S. y Roberts, S. M. (2001). Mercury in feathers from birds of the Southeastern Pacific: Influence of location and taxonomic affiliation. *Society of Toxicology, 40th Annual Meeting, San Francisco, California*.
- Ohlendorf, H. M. y Miller, M. R. (1989). Organochlorine contaminants in California waterfowl. *Journal of Wildlife Management*. 48 (3): 867-877.
- Oliveira-Ribeiro, C. A., Filipak-Neto, F., Mela, M., Silva, P. H., Randi, M. A. F., Rabbito, I. S., Alves-Costa, J. R. M. y Pelletier, E. (2006). Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research*. 101, 74-80.
- Pacheco, M. y Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in european eel

(*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53. 331-347.

Paez-Osuna, F., Ruiz-Fernández, A. C., Botello, A. V., Ponce-Vélez, G., Osuna-López, J. I., Frías-Espéricueta, M. G., López-López, G. y Zazueta-Padilla, H. M. (2002). Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: An overview. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 1296-1313.

Parslow, J. L. F., Thomas, G. J. y Williams, T. D. (1982). Heavy metals in the livers of waterfowl from the Ouse washes, England. *Environmental Pollution*. 29, 317-327.

Pattee, O. H. y Pain, D. J. (2002). Capítulo 15: Lead in the environment. *Handbook of ecotoxicology*. En: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton y J. Cairns (Editores). Lewis Publishers. Segunda edición. Boca Raton. 373-408 p.

Perkin Elmer. (1988). *Atomic absorption spectrometer operator's manual, mercury cold vapor and hydride-generation techniques*. Germany.

Plautz, S. C., Halbrook, R. S. y Sparling, D. W. (2011). Lead shot ingestion by mourning doves on a disked field. *The Journal of Wildlife Management*. 75 (4):779-785.

Post, J., Rebel, J. M. y Huurne, A. (2003). Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. *Poultry Science*. 82 (4): 591-595.

Proceedings of the Northern Pintail Workshop (2003). *The Northern pintail in North America: The problem and prescription for recovery*. Michael R. Miller, David C. Duncan, Karla Guyn, Paul Flint y Jane Austin (Editores). 6-26.

Pulsford, A. L., Thomas, M. E., Lemaire-Gony, S., Coles, J., Fossato, V. U. y Pipe, R. K. (1995). Studies on the immune system of the goby, *Zosterisessor ophiocephalus*, from the Venice Lagoon. *Marine Pollution Bulletin*. 30 (9): 586-591.

Pyle, P. (2008). *Identification guide to north american birds. Part. II. Anatidae to Alcidae*. Editorial Slate Creek Press. California. 836 p.

Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L. y Piña, B. (2008). Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N. E. Spain). *Environmental Pollution*. 155, 81-87.



- Rajaei, F., Bahramifar, N., Sari, A. E. y Ghasempouri, S. M. (2010). PCBs and organochlorine pesticides in ducks of Fereydoon-kenar wildlife refuge in Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 84, 577-581.
- Ramírez-Bojorquez, P. R. (2006). Análisis espacial de la cobertura de manglar en los municipios de Tecuala y Santiago Ixcuintla, Nayarit en el periodo de 1973-2005. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Raveling, D. G. y Heitmeyer, M. E. (1989). Relationships of population size and recruitment of pintails to habitat conditions and harvest. *The Journal of Wildlife Management*. 53 (4): 1088-1103.
- Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., Stemeroff, M. y O'Leary, C. (1995). A review of selected persistent organic pollutants. The international programme on chemical safety (IPCS) within the framework of the inter-organization programme for the sound management of chemicals (IOMC). 1-145.
- Robertson, G. J. y Gilchrist, H. G. (1998). Evidence of population declines among common eiders breeding in the Belcher Islands, Northwest Territories. *Arctic*. 51 (4): 378-385.
- Rocke, T. E. y Samuel, M. D. (1991). Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. *Journal of Wildlife Diseases*. 27(1): 1-9.
- Rodríguez-Preciado, A. (2004). Análisis comparativo de la concentración de mercurio en el tejido muscular de la lisa *Mugil curema* (Valencienes, 1836) de los Esteros Urías y Teacapán, Sinaloa, México. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Rothschild, R. F. N. y Duffy, L. K. (2005). Mercury concentrations in muscle, brain and bone of western alaskan waterfowl. *Science of the Total Environment*. 349, 277-283.
- Ruelas-Inzunza, J., Hernández-Osuna, J. y Páez-Osuna, F. (2009). Organic and total mercury in muscle tissue of five aquatic birds with different feeding habits from the SE Gulf of California, Mexico. *Chemosphere*. 76, 415-418.
- Runólfsson, O. (2011). Ver en: <http://www.fluidr.com/photos/omarrun/interesting>

- Rybakovas, A., Barsiene, J. y Lang, T. (2009). Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas. *Marine Environmental Research*. 68, 246-256.
- Ryckman, D. P., Weseloh, D. V., Hamr, P., Fox, G. A., Collins, B., Ewins, P. J. y Norstrom, R. J. (1998). Spatial and temporal trends in organochlorine contamination and bill deformities in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Canadian Great Lakes. *Environmental Monitoring Assessment*. 53, 169-195.
- Sagerup, K., Henriksen, E. O., Skorpín, A., Skaare, J. U. y Garielsen, G. W. (2000). Intensity of parasitic nematodes increases with organochlorine levels in the glaucous gull. *Journal of Applied Ecology*. 37, 532-539.
- Sanderson, G. C. y Bellrose, F. C. (1986). A review of the problem of lead poisoning in waterfowl. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois. Special Publication 4. 34 p.
- Scheifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat., C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noel, M., Piotte, P., Rieffel, D., Vaufleury, A. y Badot, P-M. (2006). Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Science of the Total Environment*. 371, 197-205.
- Scheuhammer, A. M. (1987). The Chronic Toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environmental Pollution*. 46, 263-295.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*. 31, 9-15.
- Schmitt, C. J. y Dethloff, G. M. (2000). Biomonitoring of environmental status and trends (BEST) program: Selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Information and Technology Report USGS/BRD--2000-0005. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, MO, USA.
- Schulte, A. I., Zinner, B., Millar, J. S. y Hickling, G. J. (2005). Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology*. 86 (1): 155-163.
- Schulz, J. H., Millspaugh, J. J., Bermudez, A. J., Gao, X., Bonnot, T. W., Britt, L. G. y Paine, M. (2006). Acute lead toxicosis in mourning doves. *Journal of Wildlife Management*. 70 (2): 413-421.
- Seco-Pond, J. P., Beltrame, O., Marcovecchio, J., Favero, M. y Gandini, P. (2011). Trace metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn) in feathers of black-

browed albatross *Thalassarche melanophrys* attending the patagonian shelf. *Marine Environmental Research*. 72, 40-45.

Serrano-García, L. y Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 38, 38-45.

Servicio Geológico Mexicano (2009). Panorama minero del estado de Sinaloa.

Servicio Geológico Mexicano. (2011). Ver: en: <http://www.sgm.gob.mx/index>

Sharaf, S., Khan, A., Khan, M. Z., Aslam, F., Saleemi, M. K., Mahmood, F. (2010). Clinico-hematological and micronuclear changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with vitamin E and selenium. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62, 333–341.

Shugart, L. (1994). Capítulo 5: Genotoxic responses in blood. En: M. Cristina Fossi y Claudio Loenzio (Editores). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Editorial Lewis Publishers. United States of America. 131-145 p.

Smet, H. D., Wachter, B. D., Lobinski, R. y Blust, R. (2001). Dynamics of (Cd, Zn)—metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*. 52 (3-4): 269-281.

Spalding, M. G., Frederick, P. C., McGill, H. C., Bouton, S. N. y McDowell, L. R. (2000). Methylmercury accumulation in tissues and its effects on growth an appetite in captive Great Egrets. *Journal of wildlife Diseases*. 36 (3): 411-422.

Stevenson, R. D. y Woods, W. A. (2006). Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*. 46 (6): 1169-1190.

Swartz, C. D., Donnelly, K. C., Islamzadeh, A., Rowe, G. T., Rogers, W. J., Palatnikov, G. M. Mekhtiev, A. A., Kasimov, R., McDonald, T. J. y Wickliffe, J. K. (2003). Chemical contaminants and their effects in fish and wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan. *Ecotoxicology*. 12 (6): 509-521.

Tietje, W. D. (1996). Winter feeding ecology of northern shovelers on freshwater and saline wetlands in South Texas. *The Journal of Wildlife Management*. 60 (4): 843-855 p.

Trepte, A. (2011). Ver en: <http://www.photo-natur.de;491777513688>

- Truman, P. S. y van den Hurk, P. (2010). Xenoestrogen exposure and effects in bluegill from the Reedy River, South Carolina, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 165-175.
- Tsipoura, N., Burger J., Feltes, R., Yacabucci, Y., Mizrahi, D., Jeitner, C. y Gochfeld, M. (2008). Metal concentrations in three species of passerine birds breeding in the Hackensack Meadowlands of New Jersey. *Environmental Research*. 107, 218–228.
- Tsipoura, N., Burger, J., Newhouse, M., Jeitner, C., Gochfeld, M. y Mizrahi, D. (2011). Lead, mercury, cadmium, chromium, and arsenic levels in eggs, feathers, and tissues of Canada geese of the New Jersey Meadowlands. *Environmental Research*. 1-10.
- Tucker, J. D. y Preston, R. J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*. 365, 147-159.
- USEPA. (1986). Method 7421 lead (atomic absorption, furnace technique) U.S. Environmental protection agency.
- vander Oos, R., Beyer, J. y Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57-149.
- Waalkes, M. P. (2002). Capítulo 5: Metal Carcinogenesis. En: Blbudhendra Sarkar (Editor). *Heavy metals in the environment*. Editorial Marcel Dekker, Inc. United States of America. 121-146 p.
- Walker, C. H. (2001). Capítulo 8: Organometallic compounds. *Organic pollutants, An ecotoxicological perspective*. Taylor & Francis Inc. Primera edición. London. 148-164 p.
- Walker, C. H. (2002a). Capítulo 2: Factors determining the toxicity of organic pollutants to animals and plants. En: *Organic pollutants. An ecotoxicological perspective*. Taylor & Francis Inc. Primera edición. London. 4-63 p.
- Walker, C. H. (2002b). Capítulo 3: Influence of the properties of chemicals on their environmental fate. En: *Organic pollutants. An ecotoxicological perspective*. Taylor & Francis Inc. Primera edición. London. 64-71 p.
- Warui, C. N. (1989). Light microscopic morphometry of the kidneys of fourteen avian species. *Journal of Anatomy*. 162, 19-31.
- Waterfowl Advisories for Mercury. (2005). <http://waterfowladvisories.utah.gov/>

- Watling, L. (1991). The sedimentary milieu and its consequences for resident organisms. 2. 31 (6): 789-796.
- Wayland, M., Gilchrist, H. T., Marchant, T., Keating, J. y Smits, J. E. (2002). Immune function, stress response, and body condition in arctic-breeding common eiders in relation to cadmium, mercury, and selenium concentrations. *Environmental Research Section A*. 90, 47-60.
- Wayland, M., Smits, J. E. G., Gilchrist, H. G., Marchant, T. y Keating, J. (2003). Biomarker responses in nesting, common eiders in the Canadian Arctic in relation to tissue cadmium, mercury and selenium concentrations. *Ecotoxicology*. 12, 225-237.
- Wilson, A. (2006). <http://www.naturespicsonline.com>
- Work, T. M., Rameyer, R. A., Balazs, G. H., Cray, C. y Chang, S. P. (2001). Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*. 37 (7): 574–581.
- Xuan, M. S. (2004). Use of fish biomarkers to assess the contaminant exposure and effects in lake Erie Tributaries. Tesis de doctorado. The Ohio State University.
- Yerkes, T., Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., Macleod, R. y Coluccy, J. M. (2008). Stable isotopes ( $\delta D$ ,  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{15}N$ ) reveal associations among geographic location and condition of Alaskan northern pintails. *The Journal of Wildlife Management*. 72 (3): 715-725.
- Zamani, R., Esmaili, A., Ghasempouri, S. M. y Savabieasfahani, M. (2009). Mercury in wetland birds of Iran and Iraq: Contrasting resident Moorhen, *Gallinula chloropus*, and migratory common teal, *Anas crecca*, life strategies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82, 450-453.
- Zamora-Perez, A. (2004). Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de descamación de la vagina de rata en proestro: Una alternativa para evaluar genotóxicos. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara.
- Zamora-Perez, A., Zúñiga-González, G. M., Gómez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, M. L., Batista-González, C. M. y Torres-Bugarín, O. (2004). Induction of micronucleated cells in the shed skin of salamanders (*Ambystoma sp.*) treated with colchicine or cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 44, 436–440.
- Zeljezic, D. y Garaj, V. (2004). Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*. 200, 39-47.

- Zheng, L. F. M., Zhang, B., Gao, L., Liu, W. y Zhao, X. (2007). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in eggs of eight avian species from Dongting Lake, China. *Chemosphere*. 69, 411–421.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Ibarra, M. L., Ramos-Mora, A., Ortíz, G. G. y Gallegos-Arreola, M. P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research*. 467, 99-103.
- Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Ramírez-Muñoz, M. P., Ramos, A., Fantani-Rodríguez, E., Portilla, E., García-Martínez, E., Cantú, J. M., Gallegos-Arreola, M. P. y Sánchez-Corona, J. (1996). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*. 369, 123-127.
- Zúñiga-González, G. M., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A. L., Gómez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, Ma. L., Gallegos-Arreola, P., Flores-García, A. y López-Uribe, A. (2003). Induction of Micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-Fluorouracil. *Archives of Medical Research*. 34, 141–144.
- Zúñiga-Gonzalez, G., Gómez-Meda, B., Zamora-Perez, A. L., Ramos-Ibarra, M. L., Batista-Gonzalez, C. M., Lemus-Varela, M. L., Rodríguez-Ávila, J. L., Gallegos-Arreola, M. P. (2005). Micronucleated erythrocyte frequencies in old and new world primates: Measurement of micronucleated erythrocyte frequencies in peripheral blood of *Callithrix jacchus* as a model for evaluating genotoxicity in primates. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46, 253-259.

## **X. ANEXO**

### **ANEXO I. Caracterización y recuento de células sanguíneas**

El recuento diferencial se llevó a cabo de acuerdo con Del Río et al., (2008) para la relación heterófilo/linfocito.

Una vez extraída la sangre, se colocó una gota de sangre de aproximadamente 15 µl en un portaobjeto por triplicado y con un segundo portaobjeto formando un ángulo de 30-45° se puso en contacto con la gota, y se deslizo un poco hacia atrás y luego hacia adelante para formar una película. Se secó el frotis al aire libre y luego se fijó con metanol y se esperó a que se evaporara. A continuación se cubrió todo el portaobjeto con el colorante Wright-Giemsa por 5 min, transcurrido el tiempo se añadieron 10 gotas de tiosulfato de sodio, y se dejó pasar otros 5 min, posteriormente se hizo un lavado con agua destilada y se dejó secar. Posteriormente para el montaje se colocaron 3 gotas de resina (Cytoseal 60 de baja viscosidad) y se colocó encima el cubreobjetos, se dejó secar y se contaron 100 células para obtener el recuento diferencial de leucocitos.

### **ANEXO II. Recuento de anomalías nucleares**

La prueba de las anomalías nucleares se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Zamora-Perez et al. (2004).

### **Preparación del buffer:**

En un matraz se agregó 2.16 g de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 11.49 g de fosfato monobásico de sodio monohidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); posteriormente se aforó a 1 litro con agua destilada.

### **Preparación de la tinción con naranja de acridina**

1. En dos cajas de tinción con capacidad para 50 laminillas se vaciaron 500 ml de buffer en cada una.
2. En condiciones de oscuridad, se disolvió 0.02g de naranja de acridina en una de las cajas.

### **Procedimiento de tinción**

1. Se sumergió una gradilla con las laminillas a teñir en la caja con naranja de acridina, y se mantuvieron durante 10 minutos moviéndose frecuentemente.
2. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó la gradilla y se eliminó el exceso del líquido sacudiéndola suavemente sobre papel absorbente, después se colocó durante 10 minutos en la caja que contenía únicamente buffer.
3. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó la gradilla, se sacudió y se pasaron las laminillas a una caja con tapa hasta el momento de su lectura.

### **Recuento de alteraciones nucleares (micronúcleos y prolongaciones nucleares):**

Para leer las laminillas fue necesario colocar una gota de buffer, anteriormente preparado, y cubrirlas con un cubreobjetos; el exceso de buffer se eliminó



mediante una presión suave por ambos lados con una gasa. Después se colocó una gota de aceite de inmersión para ser observada en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x.

Se cuantificaron 10,000 eritrocitos identificando EPC, EPCMN, BC, EMN y EBC (Zúñiga et al., 1996; Zúñiga-González et al., 2000; Gómez-Meda et al., 2006).

### ANEXO III. Cuantificación de metales

La cuantificación de Hg y Pb se hizo por espectrofotometría de absorción atómica, mediante el equipo Perkin Elmer Modelo 1100 B. El procedimiento para la cuantificación de los metales es el siguiente:

#### **Preparación y limpieza de plumas (Furness et al., 1986)**

Antes de iniciar con cualquier proceso de digestión de muestras, las plumas se sometieron a un procedimiento de lavado diseñado para remover cualquier contaminante superficial.

1. Se colocaron en tubos ultrasónicos y se lavaron por periodos de 10 min (con acetona 2 lavados y con agua destilada 6 lavados).
2. Enseguida se secaron las plumas en la mufla LINDBERG BLUE M 732 a 50°C, hasta que la muestra estuvo completamente seca.

#### **Digestión de plumas (EPA 1996; CEM Corp, 2001a; CEM Corp; 2001b)**

Para la digestión de plumas se usó el horno de microondas CEM Corp. Mod. MARS X con sensor de presión y temperatura. Mediante la balanza analítica

ADAM modelo AAA 160L con precisión de 0.0001 g, se pesaron  $0.5 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$  de cada muestra de plumas y 0.25 g de material de referencia (seco).

*Primera digestión:*

1. Cada muestra y material de referencia se colocaron en vasos independientes.
2. Se colocó la muestra más reactiva en el vaso control.
3. Se incluyó un blanco que consistió en solamente 5 ml de ácido nítrico al 50%.
4. Se incluyó un duplicado de una muestra en cada digestión.
5. Se adicionaron 5 ml de ácido nítrico al 50% a cada vaso.

La digestión de plumas en el horno de microondas se realizó con el método "TEJIDO C".

*Segunda digestión:*

1. Se agregaron 3 ml de peróxido de hidrógeno a cada vaso.
2. Se seleccionó de nuevo el método TEJIDO C.
3. Una vez digeridos por segunda vez, se aforó la muestra a 50 ml con agua destilada.

Después de haber efectuado los pasos anteriores, la muestra aforada estuvo lista para ser leída.

### **3.1. Cuantificación de Hg total (EPA, 1982; EPA, 1986; Perkin Elmer; 1988)**

La cuantificación de Hg total se llevó a cabo usando el accesorio generador de hidruros, el límite de detección para la determinación de este metal fue 0.001 mg/Kg, y el porcentaje de recuperación 72. El procedimiento de absorción atómica para la determinación de Hg total se basó en la absorción de la radiación a 253.7 nm por vapor de Hg.

*Reactivos:*

- Ácido sulfúrico 0.5 N: Se diluyeron 14 ml de ácido sulfúrico 96-98% en 1 L de agua bidestilada.
- Ácido nítrico al 15%: Se diluyeron 200 ml de ácido nítrico al 70% en 1 L de agua bidestilada.
- Ácido nítrico al 1.5%: Se diluyeron 17 ml de ácido nítrico al 70% en 1 L de agua bidestilada.
- Ácido clorhídrico al 10%: Se diluyeron 100 ml de ácido clorhídrico concentrado en 1 L de agua bidestilada
- Cloruro estañoso al 5% (w/v): Se pesaron 25 g de cloruro estañoso en un matraz de 500 ml y se aforó con ácido clorhídrico al 10%. Esta solución puede mantenerse en refrigeración por varios días.
- Dicromato de potasio, libre de Hg al 1% (w/v): Se disolvió 1 g de dicromato de potasio en 100 ml de agua bidestilada.
- Solución estándar de trabajo stock (1000 ppm, µg/ml): Se adquirió mediante un proveedor. La solución se mantuvo en refrigeración.
- Solución estándar de trabajo (1 ppm): Se diluyó 25 µl de solución estándar stock en ácido nítrico al 15% y se aforó a un volumen de 25 ml. Durante los análisis, se preparó solución nueva todos los días.

*Preparación de estándares y muestras:*

1. Se agregó las cantidades de solución estándar de trabajo (1 ppm) listadas en la Tabla 1 en un matraz de 50 ml; después se adicionó 500 µl de dicromato de potasio al 5% y aforó con ácido nítrico al 1.5%.

**Tabla 1. Cantidad de solución de trabajo para la preparación de estándares.**

Concentración de Estándar ( $\mu\text{g/l}$ ) ppb	$\mu\text{l}$ de solución estándar de trabajo (1 ppm)
5	250 $\mu\text{l}$
10	500 $\mu\text{l}$
15	750 $\mu\text{l}$
20	1000 $\mu\text{l}$

2. Estándar para prueba de sensibilidad: En un matraz de 50 ml se preparó un estándar de 250 ng (25  $\mu\text{g/l}$ ) utilizando 1250  $\mu\text{l}$  de la solución estándar de trabajo. Se agregó 500  $\mu\text{l}$  de dicromato de potasio al 5% y aforó con ácido nítrico al 1.5%. Se leyó esta solución en una absorbancia de aproximadamente 0.2 nm.

3. Antes de iniciar con los análisis, se estabilizaron las muestras con dicromato de potasio. Se agregó 500  $\mu\text{l}$  de dicromato de potasio al 1% y mezcló completamente.

*Análisis:*

Una vez preparadas las muestras y los estándares, se mantuvieron sin agitación manual y se procedió con la cuantificación de Hg total.

### **3.2. Cuantificación de Pb (USEPA, 1986)**

La cuantificación de Pb se realizó usando el accesorio de horno de grafito, el límite de detección para la determinación de este metal fue 0.01 mg/Kg, el porcentaje de recuperación fue 50. El procedimiento de absorción atómica para la cuantificación de plomo se basó en la absorción de la radiación a 283.3 nm.

*Preparación de soluciones:*

1. Solución stock: La solución stock de Pb de 1000  $\mu\text{g/ml}$  (ppm) se adquirió mediante proveedores. La solución se mantuvo refrigerada.

2. Solución de trabajo de 500 ppb:

Sol. 1: En un matraz de 25 ml se agregó 125  $\mu\text{l}$  de la solución stock y se aforó con ácido nítrico al 1.5% para preparar una solución de 5000 ppb.

Sol. 2: En un matraz de 25 ml se agregó 2.5 ml de esta primera solución y se aforó con ácido nítrico al 1.5% para preparar una solución de 500 ppb.

3. Preparación de estándares: En el vaso No. 2 del automuestreador se colocó el vasito de la solución de 500 ppb. El equipo realiza diluciones directamente en el grafito que resultan en tres estándares: 100, 300 y 500 ppb.

4. Preparación de la muestra: La muestra digerida se aforó a 50 ml con agua destilada, se colocó una alícuota en el vasito procurando que se llenara sin derramarse y posteriormente se colocó en el vaso del automuestreador No. 2. Una vez analizada, la muestra se sustituyó por la siguiente en el mismo sitio.

ANEXO IV. Tablas de características morfométricas de *A. clypeata* y *A. acuta*.

**Tabla 2. Características morfométricas de la especie *A. clypeata* muestreados en Escuinapa, Sinaloa mostrando el promedio y la desviación estándar.**

Muestra	Sexo	Ica	Lcu	lp	lt	la	Ico	W
01CLI	H	112	67	46	37	235	72	0.34
04CLI	H	108	64	45	37	231	73	0.42
07 CLI	H	106.4	58	41.8	45	237	66	0.3
08 CLI	H	107.5	56.3	41.9	45	231	67	0.37
09 CLI	H	108	57.9	42.5	46	230	79	0.33
10 CLI	H	107.5	58.9	42.6	45.2	222	74	0.38
11 CLI	H	114.5	64.1	46.2	44.1	234	74	0.43
17 CLI	H	111.9	58.3	46.2	40.4	234	78	0.35
18 CLI	H	121.6	57.5	44.5	46.1	241	81	0.34
19 CLI	H	115	60.9	44.3	46.1	225	73	0.35
20 CLI	H	109.5	57.4	42.6	46.7	225	76	0.3
21 CLI	H	105.5	55.2	41.8	43.6	230	70	0.32
22 CLI	H	112.8	60.1	44.8	44.8	234	79	0.36
23 CLI	H	112.2	59.5	42.8	46.7	224	67	0.37
24 CLI	H	111.9	60.3	44.2	43.2	236	71	0.4
25 CLI	H	112.3	60.5	44.1	46.3	231	72	0.37
27 CLI	H	110.9	61	43.8	46.3	227	64	0.27
03CLI	M	115	72	48	38	250	81	0.56
12 CLI	M	84.4	62.2	45.8	47.3	247	82	0.39
13 CLI	M	92	63.5	46.2	46.4	256	86	0.38
14 CLI	M	106.7	56.3	44.5	42.6	232	77	0.36
15 CLI	M	114.5	58.3	47.1	46.6	243	71	0.32
16 CLI	M	114.2	59.9	46.4	44.1	244	79	0.36
26 CLI	M	118.8	64.9	47.7	48.2	252	73	0.44
28 CLI	M	118.9	66.4	47.4	46.4	240	66	0.42
29 CLI	M	116.4	68.3	46.8	43.8	245	71	0.41
Promedio		110.32	61.10	44.81	44.34	236	73.92	0.37
DS		7.78	4.13	1.93	3.07	9.05	5.62	0.057

Ica: Longitud de cabeza; Lcu: longitud de culmen; lp: Longitud de pico; lt: Longitud de tarso; la: Longitud de ala; Ico: Longitud de cola; W: Peso sin vísceras; DS: Desviación estándar.

**Tabla 3. Características morfométricas de la especie *A. acuta* muestreados en Escuinapa, Sinaloa mostrando el promedio y la desviación estándar.**

Muestra	Sexo	Ica	Icu	Ip	It	Ia	Ico	W
05ACU	H	102.8	43.2	29.9	56	271	102	0.8
18ACU	H	105.9	49	34.6	47.9	268	102	0.63
19ACU	H	101.8	45.7	34.2	49.7	249	98	0.54
20ACU	H	108.1	50.7	36.7	52.5	263	99	0.63
21ACU	H	106.9	53.8	37.4	50.9	255	105	0.55
22ACU	H	102.7	49.1	33.6	52.4	263	111	0.68
27ACU	H	99.8	44.4	35.5	49.8	261	114	0.51
01ACU	M	108	61	40	45	296	140	0.78
02ACU	M	112	60	38	45	278	160	0.84
03ACU	M	107.8	52.7	36.9	54	295	166	0.88
04ACU	M	109.8	47.8	39.9	55	274	164	0.94
06ACU	M	107.2	47.2	39.5	58	283	91	0.82
07ACU	M	110.4	50.6	39.6	53	274	171	0.87
08ACU	M	112.7	51.6	40.3	54	279	160	0.97
09ACU	M	115.6	55.6	41.5	56	291	217	0.98
10ACU	M	106.6	49.9	39.4	54	285	178	0.74
11ACU	M	108.1	50.1	39.4	51	270	106	0.83
12ACU	M	113.6	55	40.7	53	292	161	0.73
13ACU	M	110.2	48.5	39.8	53	274	138	0.77
14ACU	M	118.5	53.3	41.7	54.9	277	186	0.71
15ACU	M	109.9	49.2	39.6	53.7	280.5	195	0.65
16ACU	M	118.8	47.7	39	54.7	276.5	175	0.69
17ACU	M	106.1	44.4	35	53.2	270	203	0.64
23ACU	M	105.5	47.4	39.1	56.6	267	172	0.73
24ACU	M	105.3	49.2	37	56.9	274	194	0.79
25ACU	M	112.1	50.9	37.9	56.3	279	141	0.77
26ACU	M	111.1	51.4	38.4	55.7	284	139	0.87
Promedio		108.789	50.348	37.948	53.044	275.148	147.704	0.753
DS		4.672	4.254	2.728	3.325	11.521	37.281	0.126

Ica: Longitud de cabeza; Icu: longitud de culmen; Ip: Longitud de pico; It: Longitud de tarso; Ia: Longitud de ala; Ico: Longitud de cola; W: Peso sin vísceras; DS: Desviación estándar.

ANEXO V. Tablas de índices de condición corporal de *A. clypeata* y *A. acuta*

**Tabla 4. Índices de condición corporal de la especie *A. clypeata*.**

Organismo	Sexo	IC	IN	IH	IB
01CLI	H	-0.1646	0.018		0.0006
04CLI	H	0.09	0.017		0.001
07 CLI	H	-0.0855	0.021	3.7	0.0003
08 CLI	H	0.1692	0.015	3.757	0.0003
09 CLI	H	-0.0256	0.018	4.182	0.0009
10 CLI	H	0.1664	0.013	2.816	0.0003
11 CLI	H	0.1063	0.015	4	0.0009
17 CLI	H	-0.0841	0.018	4.288	0.0006
18 CLI	H	-0.0869	0.017	3.677	0.0003
19 CLI	H	0.0085	0.016	3.543	0.0003
20 CLI	H	-0.0790	0.017	4.233	0.0007
21 CLI	H	0.0094	0.017	4.781	0.0006
22 CLI	H	-0.0298	0.019	4.667	0.0003
23 CLI	H	0.1536	0.015	3.757	0.0003
24 CLI	H	0.1046	0.019	3.75	0.0005
25 CLI	H	0.0546	0.018	3.676	0.0005
27 CLI	H	-0.1907	0.023	4.519	0.0004
03CLI	M	0.1931	0.014		0.0005
12 CLI	M	-0.0232	0.016	3.641	0.0010
13 CLI	M	-0.1101	0.019	4.421	0.0001
14 CLI	M	0.0154	0.017	3.083	0.0006
15 CLI	M	-0.1621	0.016	4.156	0.0002
16 CLI	M	-0.0955	0.02	3.778	0.0006
26 CLI	M	0.0474	0.014	3.023	0.0002
28 CLI	M	0.0520	0.017	3.214	0.0005
29 CLI	M	-0.0207	0.013	4.073	0.0005
Promedio		0.0005	0.017	3.858	0.0005
DS		0.109	0.002	0.519	0.0003
Mediana		-0.0061	0.017	3.757	0.0005

IC: Índice de condición; IH: Índice hepatosomático; IN: Índice nefrosomático; IB: Índice bazosomático; DS: Desviación estándar.



**Tabla 5. Índices de la condición corporal de la especie *A. acuta*.**

Organismo	Sexo	IC	IN	IH	IB
05ACU	H	0.301	0.005	2.413	0.0003
18ACU	H	-0.0617	0.012	3.460	0.0003
19ACU	H	-0.1098	0.01	3.333	0.0004
20ACU	H	-0.0989	0.011	3.159	0.0005
21ACU	H	-0.2125	0.012	3.564	0.0004
22ACU	H	0.0440	0.011	3.132	0.0009
27ACU	H	-0.1907	0.009	2.529	0.0002
01ACU	M	-0.0573	0.005		0.0003
02ACU	M	0.0432	0.001		0.0006
03ACU	M	0.1103	0.005	1.886	0.0002
04ACU	M	0.2195	0.005	2.585	0.0003
06ACU	M	0.1091	0.007	2.829	0.0004
07ACU	M	0.1117	0.007	2.138	0.0002
08ACU	M	0.2031	0.004	1.897	0.0002
09ACU	M	0.0992	0.005	1.592	0.0001
10ACU	M	-0.0567	0.006	2.243	0.0003
11ACU	M	0.1364	0.006	2.108	0.0002
12ACU	M	-0.1381	0.009	2.822	0.0004
13ACU	M	0.0129	0.009	3.403	0.0005
14ACU	M	-0.1728	0.012	3.535	0.0003
15ACU	M	-0.1852	0.014	4.554	0.0005
16ACU	M	-0.1502	0.014	3.290	0.0003
17ACU	M	-0.1032	0.013	3.984	0.0005
23ACU	M	-0.0112	0.010	2.959	0.0001
24ACU	M	0.0528	0.011	3.430	0.0004
25ACU	M	-0.0088	0.010	2.844	0.0003
26ACU	M	0.1085	0.012	2.747	0.0005
Promedio		-0.0002	0.009	2.898	0.0003
DS		0.175	0.003	0.447	0.0002
Mediana		-0.0989	0.010	3.159	0.0004

IC: Índice de condición; IH: Índice hepatosomático; IN: Índice nefrosomático; IB: Índice bazosomático; DS: Desviación estándar.

ANEXO VI. Tablas de la relación heterófilo/linfocito de *A. clypeata* y *A. acuta*

**Tabla 6. Relación H/L de la especie *A. clypeata*.**

Organismo	Sexo	H/L
01CLI	H	1.329
04CLI	H	0.055
07 CLI	H	1.08
08 CLI	H	0.699
09 CLI	H	0.436
10 CLI	H	0.215
11 CLI	H	0.244
17 CLI	H	0.078
18 CLI	H	0.191
19 CLI	H	0.197
20 CLI	H	0.562
21 CLI	H	0.162
22 CLI	H	0.123
23 CLI	H	0.105
24 CLI	H	0.088
25 CLI	H	0.08
27 CLI	H	0.134
03CLI	M	0.056
12 CLI	M	0.151
13 CLI	M	0.12
14 CLI	M	0.192
15 CLI	M	0.264
16 CLI	M	0.117
26 CLI	M	0.155
28 CLI	M	0.278
29 CLI	M	0.192
Promedio		0.281
(DS)		0.313
Mediana		0.176

**Tabla7. Relación H/L de la especie *A. acuta*.**

<b>Organismo</b>	<b>Sexo</b>	<b>H/L</b>
05ACU	H	0.235
18ACU	H	0.063
19ACU	H	0.141
20ACU	H	0.016
21ACU	H	0.073
22ACU	H	0.027
27ACU	H	0.177
01ACU	M	0.081
02ACU	M	0.1
03ACU	M	0.331
04ACU	M	0.359
06ACU	M	0.472
07ACU	M	0.112
08ACU	M	0.134
09ACU	M	0.331
10ACU	M	0.4
11ACU	M	0.336
12ACU	M	0.207
13ACU	M	0.421
14ACU	M	0.124
15ACU	M	0.126
16ACU	M	0.117
17ACU	M	0.06
23ACU	M	0.094
24ACU	M	0.011
25ACU	M	0.091
26ACU	M	0.128
Promedio		0.177
(DS)		0.134
Mediana		0.126

ANEXO VII. Tablas de EPC y eritrocitos con anomalías nucleares de la especie *A. clypeata* y *A. acuta*

**Tabla 8. EPC y eritrocitos con anomalías nucleares de la especie *A. clypeata*.**

Organismo	Sexo	EPC/ 1,000ET	EPCMN/ 1,000 EPC	BC/ 1,000 EPC	EMN/ 10,000 ET	EBC/ 10,000 ET
01CLI	H	347	0	0	1	0
09 CLI	H	248	0	0	0	0
10 CLI	H	456	0	3	0	2
11 CLI	H	448	0	1	1	0
17 CLI	H	576	1	0	0	30
18 CLI	H	468	0	5	0	102
19 CLI	H	603	1	0	2	52
20 CLI	H	433	1	3	5	23
21 CLI	H	784	2	9	8	186
22 CLI	H	748	0	3	0	60
23 CLI	H	589	0	1	3	68
24 CLI	H	825	1	4	3	84
25 CLI	H	1043	0	2	1	77
27 CLI	H	353	0	1	0	109
03CLI	M	190	0	0	0	0
12 CLI	M	578	0	0	0	3
13 CLI	M	405	0	0	2	6
15 CLI	M	638	0	0	2	19
16 CLI	M	740	10	1	1	27
26 CLI	M	429	0	5	0	107
Promedio		545.05	0.8	1.9	1.45	47.75
DS		210.002	2.238	2.404	2.064	50.892
Mediana		522	0	1	1	28.5

H:Hembras; M:Machos; (EPC/1000 ET):Eritrocitos policromáticos/1,000 eritrocitos totales; (EPCMN/1,000 EPC):Eritrocitos policromáticos micronucleados/1,000 eritrocitos policromáticos; (BC/1,000 EPC):Eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/1,000 eritrocitos policromáticos; (EMN/10,000 ET):Eritrocitos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; (EBC/10,000 ET):Eritrocitos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales; DS: Desviación estándar.

**Tabla 9. EPC y eritrocitos con anomalías nucleares de la especie *A. acuta*.**

Organismo	Sexo	EPC/ 1,000ET	EPCMN/ 1,000 EPC	BC/ 1,000 EPC	EMN/ 10,000 ET	EBC/ 10,000 ET
05ACU	H	560	0	1	0	30
18ACU	H	529	0	0	2	2
19ACU	H	497	0	0	1	8
20ACU	H	499	1	0	0	0
21ACU	H	321	0	3	0	2
22ACU	H	484	0	2	0	8
01ACU	M	236	0	0	2	0
02ACU	M	532	0	2	6	7
03ACU	M	605	0	0	0	1
04ACU	M	451	0	1	1	146
06ACU	M	610	0	7	2	17
07ACU	M	474	0	1	1	8
08ACU	M	553	0	0		5
09ACU	M	984	0	20	1	16
10ACU	M	384	0	3	1	10
11ACU	M	465	0	5	3	50
12ACU	M	457	0	6	2	20
13ACU	M	466	0	2	2	34
14ACU	M	316	1	5	5	40
15ACU	M	326	0	0	0	2
16ACU	M	507	0	3	3	9
23ACU	M	479	0	5	4	43
Promedio		487.955	0.0909	3	1.714	20.818
DS		146.361	0.294	4.386	1.707	31.766
Mediana		481.5	0	2	1	8.5

H:Hembras; M:Machos; (EPC/1000 ET):Eritrocitos policromáticos/1,000 eritrocitos totales; (EPCMN/1,000 EPC):Eritrocitos policromáticos micronucleados/1,000 eritrocitos policromáticos; (BC/1,000 EPC):Eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares/1,000 eritrocitos policromáticos; (EMN/10,000 ET):Eritrocitos micronucleados/10,000 eritrocitos totales; (EBC/10,000 ET):Eritrocitos con prolongaciones nucleares/10,000 eritrocitos totales; DS: Desviación estándar.

ANEXO VIII. Tablas de concentraciones de Hg y Pb en plumas de *A. clypeata* y *A. acuta*

**Tabla 10. Concentraciones de Hg y Pb en plumas de *A. clypeata*.**

Organismo	Sexo	Hg mg/Kg	Pb mg/Kg
01CLI	H	0.296	2.171
04CLI	H	0.165	7.100
07CLI	H	0.43	1.483
08CLI	H	0.201	2.647
09CLI	H	0.319	4.744
10CLI	H	0.774	2.233
11CLI	H	0.279	5.304
17CLI	H	0.432	2.357
18CLI	H	2.201	1.623
19CLI	H	0.333	1.471
20CLI	H	1.465	2.044
21CLI	H	0.272	4.846
22CLI	H	1.042	2.297
23CLI	H	0.515	1.7
24CLI	H	0.067	1.358
25CLI	H	0.495	7.077
27CLI	H	0.331	1.582
03CLI	M	0.359	1.604
12CLI	M	0.375	3.462
13CLI	M	1.456	1.979
14CLI	M	0.860	2.873
15CLI	M	0.384	1.69
16CLI	M	0.165	3.59
26CLI	M	0.145	2.611
28CLI	M	1.098	9.063
29CLI	M	1.799	2.399
Promedio		0.625	3.127
DS		0.558	2.035
Mediana		0.379	2.327

DS:Desviación estándar.

**Tabla 11. Concentraciones de Hg y Pb en plumas de *A. acuta*.**

Organismo	Sexo	Hg mg/Kg	Pb mg/Kg
05ACU	H	0.483	1.705
18ACU	H	0.054	11.967
19ACU	H	0.04	2.959
20ACU	H	0.035	7.7123
21ACU	H	0.165	1.949
22ACU	H	0.005	8.324
27ACU	H	0.163	2.211
01ACU	M	0.153	2.8
02ACU	M	0.025	7.443
03ACU	M	0.15	
04ACU	M	0.193	
06ACU	M	0.024	1.195
07ACU	M	0.142	1.917
08ACU	M	0.088	4.332
09ACU	M	0.04	1.556
10ACU	M	0	2.675
11ACU	M	0.166	3.04
12ACU	M	0.204	1.501
13ACU	M	0.093	1.662
14ACU	M	0.301	4.475
15ACU	M	0.26	10.071
16ACU	M	0.218	4.215
17ACU	M	0.316	0.835
23ACU	M	0.094	5.930
24ACU	M	0.02	5.408
25ACU	M	0.115	2.286
26ACU	M	0.149	
Promedio		0.137	4.090
DS		0.142	3.031
Mediana		0.137	2.88

DS:Desviación estándar.