



El Colegio de la Frontera Sur

Biomarcadores de efecto y exposición a metales pesados en
Crocodylus moreletii, en el río Hondo

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Asela Marisol Buenfil Rojas

2014

Para mi madre; todo lo que soy es gracias al sacrificio (sacro oficio) que hiciste por mí y no hay día que no agradezca a Dios por concederte este tiempo conmigo. Este y todos mis trabajos te los dedico a ti.

Para mi abuelita; ya no estás conmigo, pero fuiste una maravillosa amiga, una gran confidente, el mejor hombro para llorar y la mejor risa para compartir. Siempre te amaré y te extrañaré.

Para mi esposo; este trabajo representa nuestro triunfo sobre las adversidades, pues aunque el camino no ha sido fácil hemos crecido juntos. No tengo palabras para expresar lo mucho que significa para mí tu gran apoyo. Gracias por mostrarme siempre lo mejor de mí.

Finalmente, para mi pequeño pedacito de alegría. Aunque todavía no estás en mis brazos, todo lo que tengo y todo lo que soy es para ti.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa Álvarez Legorreta por aceptar ser mi tutora y directora de tesis. Le agradezco su paciencia, su comprensión, sus comentarios y sus valiosas enseñanzas a lo largo de este tiempo.

Al Dr. José Rogelio Cedeño Vázquez por aceptar ser mi asesor e introducirme al maravilloso mundo de los cocodrilos. Le agradezco por su optimismo, su entusiasmo, sus enseñanzas, su apoyo, sus comentarios y su disposición.

A la Dra. Concepción Ortiz Hernández por aceptar ser mi asesora y por sus atinados comentarios, así como su comprensión y sus enseñanzas.

Al Dr. David González Solís, al Dr. Benjamín Morales Vela y al Dr. Sergio Salazar Vallejo por aceptar ser mis sinodales y por sus valiosas aportaciones al manuscrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de manutención. Asimismo a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el apoyo en el trabajo de campo mediante el proyecto “Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala”.

A la Dra. Ángeles Calixto, por sus comentarios y sus consejos. Además, al Lic. José Santos Gómez Morales y a la M. en E.A. Gabriela Zacarías de León por su invaluable cooperación para obtener referencias bibliográficas valiosas para este trabajo.

En especial, a la Ing. Adriana Zavala por su invaluable apoyo en el trabajo de laboratorio. Gracias por cada tarde de análisis, por cada consejo, por todos los ánimos y por su valiosa amistad.

Al Lic. Pablo Ramos por su valiosa cooperación y disposición, así como su optimismo. También a Mauricio Pelayo por facilitarme información cartográfica valiosa para este trabajo.

A la familia Rosas Carmona por todas las facilidades y el hospedaje durante el trabajo de campo. También a Raymundo Mineros, Roberto Herrera e Irving Rosas por su apoyo y entusiasmo durante el trabajo de campo.

A mis maravillosas amigas Giany, Dalia y Daffry por creer en mí y por estar siempre conmigo, en especial cuando lo necesito. Gracias por todos los ánimos y por apoyarme en esta carretera que llamamos vida.

A mis compañeros de ECOSUR por todos y cada uno de los buenos momentos y risas; en especial a Dulce por el apoyo y los ánimos, a Fer por su increíble pericia y su invaluable cooperación en campo, a Alma y Betina por su amistad y por permitirme ser su “roomie” en Tapachula y a Roberto Andazola por su gran disposición para apoyarme en el laboratorio y su amistad.

Finalmente, a mi familia y a todas las personas que me apoyaron durante mis estudios.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	12
3. HIPÓTESIS	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Trabajo de campo	14
4.1.1. Área de estudio	14
4.1.2. Tamaño de muestra	16
4.1.3. Observación y captura de los cocodrilos	16
4.1.4. Toma de muestras sanguíneas	17
4.1.5. Toma de muestras de crestas caudales	18
4.1.6. Obtención de plasma sanguíneo	19
4.2. Análisis en laboratorio	20
4.2.1. Lavado de material	20
4.2.2. Análisis de Hg, Cd, Cu y Zn en plasma sanguíneo y crestas caudales	20
4.2.3. Análisis de metalotioneínas totales por el método de saturación de plata	22
4.2.3.1. Extracción de citosol en crestas caudales	22
4.2.3.2. Análisis en plasma sanguíneo y citosol de crestas caudales	22
4.3. Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Tamaño de muestra obtenido	24
5.2. Metales pesados (Cd, Cu, Hg y Zn) y metalotioneínas (MTs)	24
5.2.1. Plasma sanguíneo	24
5.2.2. Crestas caudales	25
5.3. Análisis Estadísticos	28
5.3.1. Metales pesados en plasma sanguíneo	29
5.3.2. Metales pesados en crestas caudales	32
5.3.3. Metalotioneínas en plasma sanguíneo	36
6. DISCUSIÓN	38
6.1 Biomarcadores de exposición	38
6.1.1. Plasma sanguíneo	38
6.1.2. Crestas caudales	43
6.1.3. Fuentes potenciales de metales pesados en <i>Crocodylus moreletii</i>	46
6.2. Metalotioneínas como biomarcadores de efecto	49
7. CONCLUSIONES	53
8. RECOMENDACIONES	55
9. LITERATURA CITADA	56
10. ANEXOS	68
10.1 Artículo enviado a Archives of Environmental Contamination and Toxicology	68

RESUMEN

En los últimos años, los biomarcadores han sido utilizados para medir la exposición y el efecto de los metales pesados en los organismos, como un indicador de aviso temprano de contaminación. En particular, las metalotioneínas (MTs) han sido utilizadas como biomarcador de efecto por su capacidad de enlazar metales. Aunque la presencia de metales en el río Hondo ha sido reportada, no se ha documentado su presencia en el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). El presente estudio utilizó las concentraciones de cadmio (Cd), mercurio (Hg), cobre (Cu) y Zinc (Zn) como biomarcadores de exposición y las MTs totales como biomarcador de efecto en el plasma sanguíneo y crestas caudales de los cocodrilos del río Hondo. Se realizaron dos muestreos en tres transectos del río Hondo; en total, se colectaron 13 muestras de plasma y 24 crestas caudales. Para el análisis de metales, se utilizó la digestión húmeda y la detección por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y para el análisis de MTs se utilizó el método de saturación de plata. En plasma, el Cd fue detectado en el 69% (n= 9) de las muestras, el Hg en el 46% (n= 6), el Zn en el 15% (n= 2) y las MTs en el 92% (n= 12). En las crestas, el Hg fue detectado en el 83% (n= 20) de las muestras, mientras que los otros metales fueron analizados en 13 crestas, de las cuales el Cd se detectó en el 85% (n= 11) y el Zn en el 54% (n= 7). No se detectó Cu en ninguna muestra y no se encontraron MTs en crestas. Se observaron relaciones positivas entre la talla y la concentración de Hg en plasma sanguíneo. En plasma, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de Cd en los transectos muestreados y entre la concentración de Hg en las clases de edad. En crestas, se observaron diferencias significativas entre la concentración de Cd en machos y

hembras subadultos. Finalmente, se observó una tendencia entre la concentración de Cd y las MTs del plasma sanguíneo por clases de edad. Se informa por primera vez de la presencia de MTs en sangre, como un biomarcador de efecto en cocodrilos en vida libre. Se recomienda implementar un programa de monitoreo a largo plazo en el río Hondo para evaluar posibles variaciones temporales en las concentraciones de metales pesados y la calidad del hábitat en la cuenca.

Palabras clave: Metalotioneínas, Cadmio, Mercurio, Zinc, Cocodrilo de pantano, Plasma sanguíneo, Crestas caudales.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años, la contaminación por metales pesados se ha incrementado, afectando considerablemente ecosistemas acuáticos y terrestres (Schneider et al., 2013). Debido a la alta persistencia de los metales en los desechos de las actividades agrícolas y en las aguas residuales, los organismos podrían verse severamente afectados (Defew et al., 2005; Schneider et al., 2013). La acción de los metales pesados en los sistemas acuáticos es considerable, porque no son biodegradables, presentan alta toxicidad y ejercen efectos negativos en la salud de los organismos (Buenfil-Rojas y Flores-Cuevas, 2007). Entre los procesos regulatorios y metabólicos más afectados por la presencia de metales pesados se encuentran la respiración celular, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis y secreción hormonal, la reproducción y el crecimiento (Fingerman et al., 1996). Sus efectos dependen de la concentración de exposición, ya que en grandes cantidades producen importantes efectos subletales o hasta la muerte (Rodríguez et al., 1998).

Los biomarcadores son herramientas de monitoreo que hacen referencia a las señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico; es decir, componentes orgánicos e inorgánicos que un organismo no requiere para su óptimo desarrollo (Silbergeld y Davis, 1994). En este sentido, existen tres tipos de biomarcadores: de exposición, susceptibilidad y efecto (Walker et al., 1996). Los biomarcadores de exposición se refieren a compuestos (como los metales pesados) dentro del organismo que reflejan una exposición a algún contaminante. Los biomarcadores de susceptibilidad son sensibles al efecto de un compuesto tóxico. Generalmente, estos efectos son medidos

en función de factores genéticos (ADN, ARN) (Gil-Hernández, 2000). Los biomarcadores de efecto son indicadores de cambios bioquímicos en un organismo (alteraciones enzimáticas y en la bioquímica sanguínea, aumento de proteínas), producto de la exposición a algún contaminante (Gil-Hernández, 2000).

A diferencia de los metales fisiológicos como el cobre (Cu) y el zinc (Zn), los cuales pueden generar reacciones tóxicas cuando su concentración es excesiva (Kolf-Clauw et al., 2007), los metales xenobióticos, como el cadmio (Cd) y el mercurio (Hg), pueden acumularse en los tejidos y biomagnificarse en las redes tróficas (Heaton-Jones et al., 1997). Por esta razón, los metales pesados como biomarcadores de exposición han sido estudiados en diversas especies, siendo los estudios en reptiles los más escasos (Smith et al., 2007).

Las metalotioneínas (MTs) son consideradas como un indicador de aviso temprano de contaminación por metales pesados porque se ha demostrado que éstas suelen inducirse en presencia de metales fisiológicos (Zn y Cu) y metales xenobióticos (Cd y Hg) (Nordberg & Nordberg, 2009). Debido a que son capaces de unir metales pesados, han sido utilizadas como biomarcadores de efecto. Aunque sus funciones fisiológicas siguen siendo objeto de debate, se ha establecido que las MTs son importantes reguladores del metabolismo del Zn y Cu. Sin embargo, bajo condiciones de alta exposición a metales fisiológicos, las MTs funcionan como un sistema de desintoxicación, pues al fijar los iones de metales pesados se mantiene una baja concentración intracelular (Brambila-Colombres y Lozano-Zarain, 1999). En cambio, en presencia de metales xenobióticos como el Cd y Hg, la inducción de MTs actúa como

un sistema de desintoxicación en los organismos expuestos a metales, pues cuando ambos se ligan a las MTs, los complejos actúan en los tejidos de los organismos como un sistema de protección contra toxicidad por metales (Amiard et al., 2006). Existen cuatro isoformas de MTs, de las cuales las de tipo I y II son de interés para esta investigación. Esto es porque las MT-I y -II se expresan en casi todos los tejidos del organismo, especialmente en órganos como el hígado, riñón, intestino, gónadas, pulmón, corazón y cerebro (Scott-López, 2007).

Los metales pesados en reptiles han sido ampliamente reconocidos como una de las mayores amenazas para estas poblaciones (Smith et al., 2007). Las vías de exposición en reptiles son mayores que las de los mamíferos, ya que pueden absorber metales pesados por ingestión accidental o voluntaria, contacto dérmico, inhalación, transferencia materna e incluso del medio en el que se encuentran los nidos (Smith et al., 2007; Schneider et al., 2013). Aunque en los últimos años se han realizado estudios de metales pesados y su relación con las MTs en distintos tipos de reptiles (Burger et al., 2005; Smith et al., 2007; Andreani et al., 2008), los estudios de metales pesados y MTs en cocodrilianos son muy limitados (Bell y López, 1985; Schneider et al., 2013).

La península de Yucatán se caracteriza por poseer suelos de tipo cárstico y pocas corrientes de agua superficiales, las cuales se limitan al río Candelaria y al río Champotón en Campeche y al río Hondo en Quintana Roo (Euán-Ávila et al., 2002). El río Hondo se localiza al sur de Quintana Roo y constituye el límite geográfico entre México y Belice (Magnon-Basnier, 2002). Estudios realizados en el río Hondo han reportado la presencia de metales pesados en sedimentos debido al uso de

agroquímicos en las actividades agrícolas y las descargas de aguas residuales de los asentamientos humanos (Euán-Ávila et al., 2002; García-Ríos y Gold-Bouchot, 2003).

Si bien la contaminación por metales pesados en el río Hondo ya ha sido estudiada, no se ha documentado la presencia de metales pesados ni MTs en cocodrilos. Estudios con crestas caudales de *C. moreletii* en cuerpos de agua de la zona norte de Belice, demostraron que estos han sido expuestos a metales como Cd y Hg (Rainwater et al., 2002; 2007). Por tal motivo, es preciso investigar si la población de *C. moreletii* del río Hondo está siendo expuesta a metales pesados y si como respuesta a esta exposición sintetizan MTs. Por lo tanto, en esta investigación, se evaluó la concentración de metales pesados (Cd, Hg, Cu y Zn) como biomarcadores de exposición en los cocodrilos del río Hondo y la concentración de MTs totales como biomarcador de efecto.

Antecedentes

Los cocodrilianos (Orden Crocodylia) son considerados especies clave, ya que son organismos tope en la cadena alimenticia y desempeñan un rol muy importante en los ecosistemas donde habitan. Son depredadores sobre especies de peces y otros animales, incrementan el reciclaje de nutrientes, proporcionan refugios de agua para otras especies durante la época de sequía y mantienen abiertos los cursos de agua (Cedeño-Vázquez, 2002). En el río Hondo, habita el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*, Duméril y Bibron, 1851; Fig.1) (Cedeño-Vázquez et al., 2006) que es una especie protegida por distintas normas y convenciones. En la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059) se encuentra sujeta a protección especial, mientras que en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN en inglés) se considera que la amenaza para esta especie es de preocupación menor (Least Concern, LC) (Cedeño-Vázquez et al., 2012). Además, la especie está incluida en los Apéndices I (Guatemala) y II (México y Belice) de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES en inglés) (CITES, 2013).

En los últimos 30 años, diversos estudios han reportado presencia de metales pesados en distintas especies de cocodrilianos (Delany et al., 1988; Heaton-Jones et al., 1997; Burger et al., 2000; Almli et al., 2005; Campbell et al., 2010; Schneider et al., 2012). Además, se ha estudiado la extraordinaria capacidad de estos reptiles para acumular dichos metales, así como las posibles vías de desecho para evitar la intoxicación (Peters, 1983; Xu et al., 2006).



Figura 1. Juvenil de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) capturado en el Río Hondo. Foto: A.M. Buenfil Rojas.

Las crestas caudales de los cocodrilianos han sido utilizadas como biomarcadores de exposición a metales pesados y otros contaminantes (Schneider et al., 2013). También se han realizado estudios en tejidos internos, en los cuales se ha analizado la posible relación de la concentración de metales pesados en crestas con la concentración en riñones, hígado y músculo de la cola (Heaton-Jones et al., 1997; Burger et al., 2000). Hasta la fecha, no se ha documentado la presencia de metales pesados en sangre total, plasma sanguíneo o eritrocitos, por lo cual se desconoce la relación que los metales en la sangre podrían tener con los metales en órganos internos de estos

reptiles, así como los procesos bioquímicos que podrían regular la presencia de metales fisiológicos y xenobióticos (Smith et al., 2007; Hidalgo et al., 2009; Schneider et al., 2013).

C. moreletii ha sido objeto de estudios diversos, que han abordado aspectos de conservación, análisis genético, hábitos alimentarios, reproducción y comercialización (Cedeño-Vázquez, 2002; Platt et al., 2006; García-Grajales y López-Luna, 2010). En el norte de Belice, Rainwater et al. (2002) realizaron un estudio de concentraciones de mercurio en huevos (n= 31) en el que determinaron que dicho metal pudo haberse adquirido por contaminación natural, antropogénica, o incluso por transmisión materna. Posteriormente, Rainwater et al. (2007) reportaron concentraciones de metales pesados en crestas caudales de esta especie en los distritos Orange Walk y Corozal, Belice. Ellos consideraron a las crestas caudales como indicadores no-letales de acumulación de contaminantes y recomendaron realizar estudios que incluyeran relaciones entre la concentración de metales en las crestas caudales, los tejidos internos y las condiciones ambientales en los sitios de colecta.

Las MTs fueron caracterizadas por primera vez por Margoshes y Vallee (1957) en un estudio que consistió en aislarlas a partir de la corteza renal equina. Son proteínas intracelulares de bajo peso molecular (menor a 7 kDa) compuestas por 61 a 68 aminoácidos y con alta proporción de cisteínas (Cys) (Scott-López, 2007). Aunque las MTs han sido ampliamente estudiadas en mamíferos e invertebrados, los estudios de MTs en reptiles son muy limitados. Hidalgo et al. (2009) mencionaron que al igual que ocurre en mamíferos y aves, la presencia de Cd en reptiles puede inducir la expresión

de las MTs. Al respecto, Flos et al. (1986) reportaron la presencia de MTs en la lagartija de las rocas (*Podarcis muralis*), Simoniello et al. (2010) en la lagartija italiana (*P. sicula*), Yamamura y Suzuki (1984) en la tortuga galápagos amarilla de Asia (*Clemmys mutica*) y Bell y López (1985) en el aligátor americano (*Alligator mississippiensis*). También se han identificado MTs en especies de anfibios, como la salamandra japonesa vientre de fuego (*Triturus pyrrhogaster*) (Suzuki et al., 1984), así como en la salamandra proteo (*Proteus anguinus*) y la salamandra acuática perro de agua (*Necturus maculosus*) (Dobrovoljc et al., 2003). Hasta la fecha, no se ha reportado presencia de MTs en fracciones sanguíneas ni en otros tejidos de cocodrilianos.

Los métodos utilizados, hasta ahora, para el estudio de MTs en organismos, tienden a ser destructivos porque involucran la muerte de los mismos (Fossi y Marsili, 1997). Investigaciones realizadas con sangre indican que, incluso después de una sola exposición, se pueden encontrar proporciones considerables de cadmio–metalotioneína (Cd-MT) en el plasma sanguíneo (Nordberg y Nordberg, 2009). Esto es porque, en teoría, la mayor parte de las MTs ligadas a metales se acumulan en órganos parenquimatosos, tales como el hígado y los riñones (Nordberg y Nordberg, 2009). Sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios donde se ha identificado Cd-MT en plasma sanguíneo. Esto ocurre porque el Cd es transportado por medio del plasma hasta al hígado, donde se une a la MT. Entonces, el complejo (Cd-MT) es liberado al torrente sanguíneo y es transportado al riñón, donde es absorbido por endocitosis (Nordberg y Nordberg, 2009). Aunque este mecanismo sólo ha sido estudiado con el Cd, ésto confiere validez al estudio de metales y MTs en plasma sanguíneo y proporcionaría una herramienta de biomonitoreo eficaz sin ser destructiva.

Actualmente, se están realizando estudios de MTs en la piel de mamíferos e incluso del ser humano, ya que recientemente se ha descubierto que la isoforma MT-IV se expresa en el epitelio escamoso estratificado de la piel, la lengua y el tracto alimentario superior (Santucci et al., 2000). Debido a esto, se ha estudiado la posibilidad de que las isoformas MT-I y MT-II también se expresen en la piel, ya que es frecuente encontrarlas en tumores dérmicos (producto de exposición a componentes metálicos) (Santucci et al., 2000). Estudios en células de la piel de seres humanos demostraron que MT-I y MT-II se expresan en los queratinocitos basales de la epidermis (Van-deer-Oord y De-Ley, 1994). Los reptiles se caracterizan por presentar una piel dura y seca que consta de una fina epidermis y una dermis más gruesa; las escamas de los reptiles se derivan fundamentalmente de la epidermis y están constituidas por queratina. En el caso de los cocodrilianos, las escamas pueden permanecer toda su vida y crecer gradualmente (Ortiz-Cervantes y Rubio-Lozano, 2012). Por ello, se considera altamente probable detectar concentraciones de MTs en las crestas caudales de *C. moreletii* del río Hondo.

Por tratarse de una especie protegida, el análisis de MTs en hígado o riñones de *C. moreletii* es inviable. Por ende, el análisis en plasma sanguíneo y crestas caudales representa una excelente área de oportunidad para el monitoreo de esta especie y para generar un antecedente de metales pesados en cocodrilos del río Hondo.

Planteamiento del problema

Se desconoce la presencia de metales pesados en los cocodrilos del río Hondo, pese a que este tipo de contaminación ha sido reportada para este cuerpo de agua. Por otra parte, no se ha reportado presencia de MTs en plasma sanguíneo y crestas caudales de los cocodrilos.

Preguntas de investigación

1. ¿Qué concentraciones de Cd, Hg, Cu y Zn presentan los cocodrilos del río Hondo en plasma sanguíneo y crestas caudales?
2. ¿La exposición a metales pesados propicia que los cocodrilos sintetizen MTs en plasma sanguíneo y crestas caudales como un biomarcador de efecto?

2. OBJETIVOS

General

Determinar la concentración de metales pesados (Cd, Hg, Cu y Zn) en el cocodrilo de pantano del río Hondo como biomarcador de exposición y la presencia de metalotioneínas (MTs) como biomarcador de efecto en plasma sanguíneo y crestas caudales.

Específicos

1. Evaluar como biomarcadores de exposición las concentraciones de Cd, Hg, Cu y Zn en plasma sanguíneo y crestas caudales de *C. moreletii*.
2. Evaluar como biomarcador de efecto, los niveles de MTs totales en plasma sanguíneo y en crestas caudales de *C. moreletii*.
3. Comparar relaciones entre biomarcadores de exposición y efecto con la talla y peso de los organismos, así como diferencias entre transectos, clases de edad y sexos.

3. HIPÓTESIS

Si los cocodrilos están expuestos a contaminación por metales pesados (Cd, Hg, Cu y Zn) en el río Hondo, es posible que sintetizen MTs en respuesta a la presencia de metales pesados en plasma sanguíneo y crestas caudales. Por lo tanto, se plantea la siguiente hipótesis:

La síntesis de MTs estará en proporción a la concentración de metales pesados en el plasma sanguíneo y crestas caudales de *C. moreletii*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los fines de esta investigación, se obtuvieron los permisos correspondientes de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVVS) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), los cuales fueron otorgados mediante los oficios: NUM/SGPA/DGVVS/04288/12 y NUM/SGPA/DGVVS/00911/13.

4.1. Trabajo de campo

4.1.1. Área de estudio

A pesar de ser una falla geológica, el río Hondo es considerado como el único río de Quintana Roo; al mismo tiempo, representa la frontera entre México y Belice. Tiene una longitud aproximada de 112 km desde el poblado La Unión hasta su desembocadura en la bahía de Chetumal (SRE-CILA, 1998; Cedeño-Vázquez et al., 2011).

Se realizaron dos muestreos en tres transectos (con una longitud aproximada de 15 km cada uno), los cuales se denominaron La Unión, Cocoyol y San Rafael de Pucté (Fig. 2). Estos transectos fueron elegidos por su relativamente fácil acceso y considerando las posibles fuentes de contaminación por metales pesados (Álvarez-Legorreta, 2007), además de que los cocodrilos generalmente son territoriales y permanecen en su ámbito hogareño (Cupul-Magaña et al., 2010); por ello, se asume que presentan una movilidad limitada a lo largo del río.

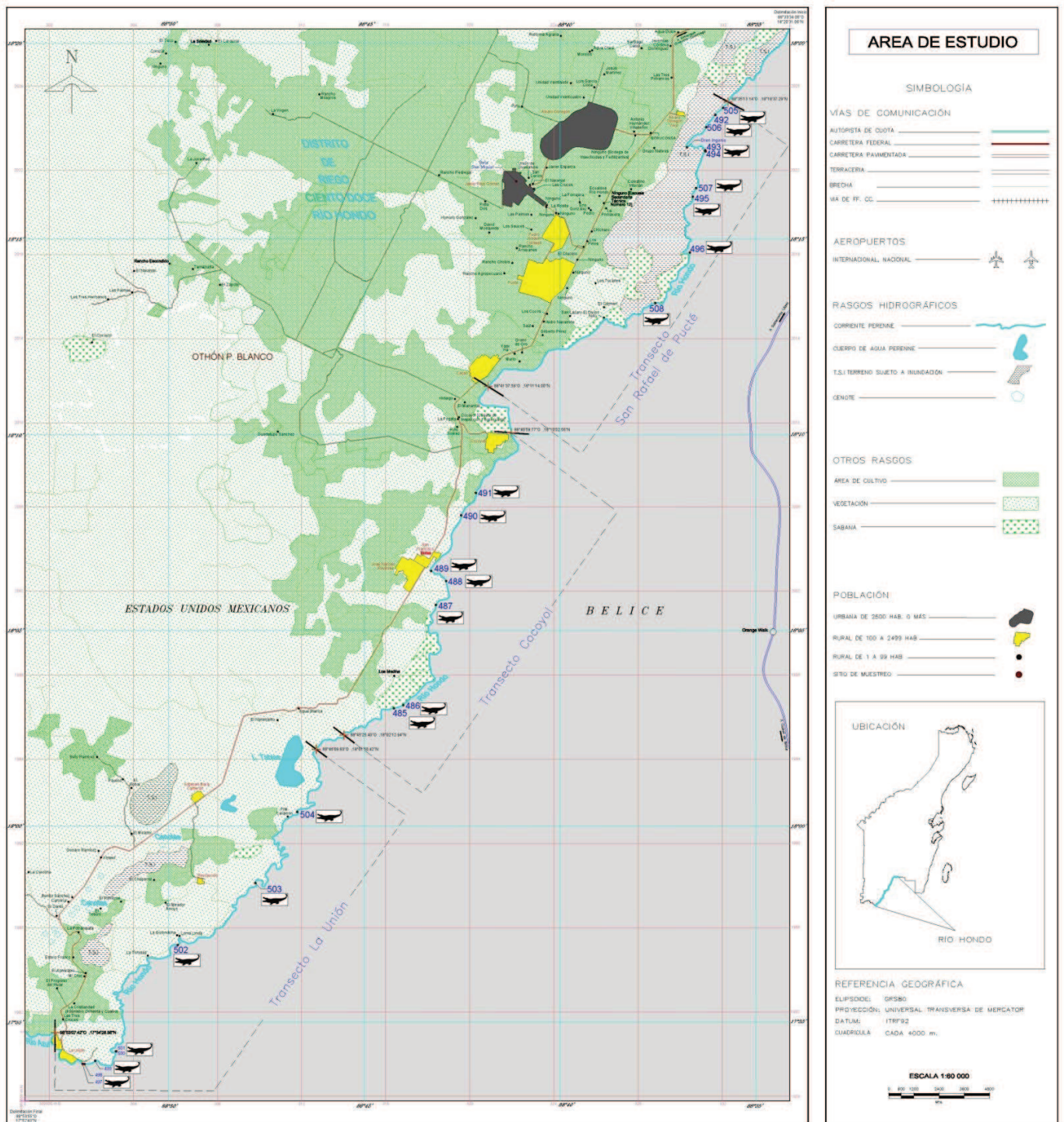


Figura 2. Transectos muestreados en el río Hondo, se indica las áreas de cultivo, las zonas urbanas y rurales (INEGI, 2013) y los ejemplares capturados en cada transecto.

4.1.2. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra (n= 20) se definió por comparación con estudios previos relacionados con el tema (Heaton-Jones et al., 1997; Burger et al., 2000; Almlí et al., 2005; Rainwater et al., 2007; Campbell, et al. 2010).

4.1.3. Observación y captura de los cocodrilos

Para los fines de la investigación, se utilizaron los métodos de marcaje y recaptura de *C. moreletii*, de acuerdo con Woodward y Marion (1978), Messel (1981) y Domínguez-Laso et al. (2011), mismos que han sido aplicados previamente en el área de estudio por Cedeño-Vázquez et al. (2006, 2011). Ambos muestreos se realizaron con una lancha pantanera equipada con un motor fuera de borda de 15 HP; además, se procuró iniciar después del atardecer y finalizar antes del amanecer, evitando condiciones adversas (ej. lluvia, niebla, viento fuerte) (Woodward y Marion, 1978; Messel, 1981).

Las capturas se realizaron directamente con la mano o mediante un lazo de acero y pértiga, dependiendo de la proximidad y el tamaño de los cocodrilos. Al momento de la captura, la pértiga armada se introdujo hasta la región del cuello del ejemplar para asegurar su captura. Una vez que los ejemplares fueron inmovilizados, se colocó una liga resistente para mantener cerradas sus mandíbulas. Asimismo, se cubrieron los ojos para reducir el estrés y las posibles reacciones bruscas del animal (Sánchez-Herrera et al., 2011).

Se tomaron los datos de cada espécimen capturado en una hoja de registro diseñada exprofeso. Se registraron las coordenadas del lugar de captura, hora, temperatura, sexo, longitud total, longitud hocico-cloaca, así como la longitud del cráneo, perímetro de la base de la cola y peso. Con los datos de longitud total se determinaron las clases de edad de los cocodrilos capturados, las cuales fueron establecidas de la siguiente forma: cría (< 0.5 m), juvenil (0.51-1.0 m), subadulto (1.01-1.5 m), adulto (1.51-2.0 m) y adultos grandes (> 2.01 m) (Sigler et al., 2011). Todos estos datos se recopilaban a partir de la hoja de registro del manual de monitoreo de la especie (Sánchez-Herrera et al., 2011).

4.1.4. Toma de muestras sanguíneas

Para la toma de muestras de sangre, se siguieron los lineamientos del manual de monitoreo del cocodrilo de pantano (Sánchez-Herrera et al., 2011). De acuerdo con el tamaño y peso del ejemplar, se extrajeron entre 3 y 6 ml de sangre de cada individuo. Bajo ninguna circunstancia se extrajo sangre de ejemplares menores a 60 cm. Previo a la obtención de sangre, se esterilizó la zona de punción con alcohol etílico comercial. La sangre se obtuvo por medio de agujas especiales para Vacutainer® con heparina de litio como anticoagulante, utilizando la técnica de punción de la vena yugular profunda a la altura de la nuca (Fig. 3).

Una vez obtenida la sangre, se mezcló cuidadosamente por inversión. Las muestras se etiquetaron de acuerdo con un código de marcaje y se almacenaron refrigeradas hasta la separación del plasma sanguíneo.



Figura 3. Obtención de la muestra de sangre en un individuo adulto de *C. moreletii*. Foto: R. Mineros-Ramírez.

4.1.5. Toma de muestras de crestas caudales

Las crestas caudales que se aprovecharon fueron las utilizadas para el marcaje de individuos (Fig. 4). Para cada toma de muestra se utilizó una hoja de bisturí nueva y una vez que fueron obtenidas, se colocaron en recipientes de plástico con capacidad de 15 ml (previamente tratados con una solución de HNO₃ 5%), rotulados con el código de marcaje. Como medida antiséptica, después de obtener la muestra se aplicó una solución de yodo en el lugar de la biopsia. Las muestras se almacenaron refrigeradas y una vez en el laboratorio, fueron congeladas hasta los análisis (Rainwater et al., 2007).



Figura 4. Procedimiento para marcar un individuo juvenil de *C. moreletii*, mediante el corte de crestas caudales. Foto: J. Pérez-Flores.

4.1.6. Obtención de plasma sanguíneo

Para cuantificar la concentración de metales pesados (Cd, Hg, Cu y Zn) y MTs en plasma sanguíneo, se separó por centrifugación (3157 RPM durante 15 minutos) el plasma de la muestra total de sangre en una centrífuga portátil (Mobilespin, Yulcon Technology); en seguida, se separó cuidadosamente por aspiración el plasma sobrenadante (Bienengräber et al., 1995).

El plasma fue separado en tres alícuotas: 1 ml para el análisis de Cd, Cu y Zn; 1 ml para el análisis de Hg y 1 ml para el análisis de MTs. Las alícuotas se mantuvieron congeladas (-20° C) hasta los respectivos análisis.

4.2. Análisis en laboratorio

4.2.1. Lavado de material

Todos los materiales fueron lavados con detergente libre de fosfatos (EXTRAN neutro) en solución 1:1 y con soluciones ácidas (HNO₃ 5% y HCl 1N). Todo el material fue enjuagado con agua destilada y se dejó secar durante por lo menos 24 horas (Perry et al., 1975; Andreani et al., 2008). Una vez seco el material, se selló con parafilm y se almacenó hasta los respectivos análisis.

4.2.2. Análisis de Hg, Cd, Cu y Zn en plasma sanguíneo y crestas caudales

Para la cuantificación de metales pesados, se adaptó el método a partir de los trabajos de Perry et al. (1975), Delany et al. (1988), Rainwater et al. (2007) y Andreani et al. (2008). Primeramente, se procedió a descongelar las muestras a temperatura ambiente. Una vez descongeladas por completo, se transfirieron entre 0.5 ml y 1 ml de plasma en un vaso de teflón de 100 ml o entre 0.2-0.5 g de tejido de las crestas caudales. En el caso de las crestas, antes de transferirlas al vaso de teflón, las muestras fueron enjuagadas con agua desionizada para retirar impurezas y cualquier posible contaminación externa. Se añadió a cada vaso HNO₃ concentrado; para evitar evaporación, se taparon con un vidrio de reloj y se dejaron en pre-digestión. Pasado el tiempo de pre-digestión, las muestras fueron calentadas a aproximadamente 90° C durante seis horas, las cuales se dividieron en dos fases. Una vez que terminó la

primera fase de calentamiento, se dejaron enfriar y se les añadió H_2O_2 al 30%. Se calentaron nuevamente a la misma temperatura (segunda fase de calentamiento). Al concluir la digestión, las muestras fueron enfriadas, filtradas con papel filtro Whatman no. 2 en matraces volumétricos de 10 ml y llevadas a volumen con HNO_3 al 1%. En el caso del Hg, las muestras fueron filtradas en matraces volumétricos de 25 ml y se incubaron con KMnO_4 a temperatura ambiente hasta la persistencia del color violeta (método adaptado de: Sánchez-Rodríguez, 2009; Triunfante et al., 2009). Finalmente, las soluciones se aclararon y fueron llevadas a volumen con agua desionizada.

Los análisis de Cu y Zn fueron realizados por el método de aspiración directa en un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) (modelo Avanta PM, marca GBC) con accesorio de flama. Para analizar el Cd, se utilizó el mismo espectrofotómetro con el accesorio horno de grafito (modelo GF 3000, marca GBC) y para el Hg se utilizó el generador de hidruros (modelo HG 3000, marca GBC). Para efectuar las lecturas de cada metal se prepararon las respectivas curvas de calibración con estándares de Hg (Merck), Cd (UltraScientific), Cu (Merck) y Zn (Merck). Los límites de detección para cada metal fueron: 2.3 ng/g para Hg, 3.9 ng/g para Cd y 90 ng/g para Cu y Zn.

Para asegurar la calidad del análisis, se determinó la precisión de la digestión de las muestras con material de referencia certificado TORT-2 (hepatopáncreas de langosta) del Consejo Nacional de Investigación de Canadá (NRC-CNRC). Cada lote de análisis incluyó un blanco, al cual se le aplicó el mismo tratamiento que a las muestras. Con esta validación se obtuvieron los siguientes porcentajes de recuperación: $94.3\% \pm 9.5$ para Hg, $92.1\% \pm 3$ para Cd, $98.3\% \pm 5.7$ para Cu y $80.5\% \pm 4.5$ para Zn.

4.2.3. Análisis de metalotioneínas totales por el método de saturación de plata

4.2.3.1. Extracción de citosol en crestas caudales

Siguiendo el método de Scheuhammer y Cherian (1991), se colocaron 0.2-0.5 g de crestas caudales congeladas en un tubo de rosca de 5 ml. Se añadieron 4 volúmenes de solución de sacarosa (0.25 M) y se homogeneizaron a alta velocidad por 5 minutos, debido al nivel de dureza del tejido. Se centrifugó el resultante homogeneizado a 18 000 g durante 20 minutos. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo Eppendorf y fue congelado hasta el análisis de MTs. En el caso del plasma, se tomaron alícuotas de forma directa.

4.2.3.2. Análisis en plasma sanguíneo y citosol de crestas caudales

Aplicando el método de Scheuhammer y Cherian (1991) y Bienengrüber et al. (1995), se colocaron alícuotas de plasma y citosol de crestas en tubos Eppendorf. Se les agregó solución buffer de glicina hasta completar 800 μ L. Se agitaron las muestras y a continuación se añadieron 500 μ L de solución de trabajo (20 μ g Ag^+ /ml). Se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente. Enseguida, se agregaron 100 μ L de hemoglobina (15 g/dL) y se calentaron en baño maría a 100° C. Se centrifugaron los tubos a 1200 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron nuevamente 100 μ L de hemoglobina y se calentaron nuevamente en baño maría a 100° C. Entonces, se aspiró con cuidado el sobrenadante de cada muestra y se colectó en otro tubo Eppendorf. Se aspiró el sobrenadante, se transfirieron a matraces volumétricos de 5 ml y fueron llevados a volumen con HNO_3 1%. Finalmente, se transfirieron a un tubo de vidrio con tapa de rosca y se midió la concentración de Ag del sobrenadante final por EAA con flama. Se generó una curva de calibración con un estándar de Ag (Merck) en

buffer de glicina. Para realizar los cálculos, se consideró que 1 μg de Ag^+ representa 3.55 μg de MTs. El límite de detección de MTs por el método de saturación de plata fue de 700 ng/ml.

Para evaluar la calidad del análisis, se utilizó el estándar de referencia COP03 Metallothionein 95% (metallothionein from rabbit liver) del laboratorio Creative Biomart (NY, EUA). Cada lote de análisis incluyó un blanco, al cual se le aplicó el mismo tratamiento que a las muestras. Con esta validación se recuperó $89.2\% \pm 1.9$ de MTs.

4.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 7.0 (Statsoft). Debido al reducido tamaño de muestra ($n < 30$), y a que los datos no presentaron normalidad ni homogeneidad de varianzas, se utilizaron pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para detectar diferencias en las concentraciones de metales y MTs entre sexos. Asimismo, se utilizó la prueba de Wilcoxon para evaluar diferencias entre las concentraciones de metales y MTs en plasma sanguíneo y crestas caudales. Adicionalmente, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para identificar diferencias en las concentraciones de metales y MTs entre los tres transectos muestreados y entre clases de edad. Se realizaron correlaciones de Spearman para detectar relaciones entre las concentraciones de metales y MTs. Finalmente, se efectuaron regresiones lineales para detectar relaciones entre las concentraciones de metales y MTs con la longitud hocico-cloaca (LHC), longitud total (LT) y peso. Para los fines de esta investigación, todas las pruebas se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Tamaño de muestra obtenido

En total se capturaron 24 ejemplares en los dos muestreos realizados en septiembre de 2012 (n= 7) y en abril de 2013 (n= 17). Se procesaron 24 crestas caudales y 13 muestras de plasma debido a que 3 muestras se hemolizaron, lo cual imposibilitó la separación en fracciones sanguíneas. Además, recordando lo mencionado en los métodos de este trabajo, no se extrajo sangre de 8 ejemplares cuya longitud total fue <60 cm.

5.2. Metales pesados (Cd, Cu, Hg y Zn) y metalotioneínas (MTs)

5.2.1. Plasma sanguíneo

No se obtuvieron valores detectables de Cu en ninguna muestra (límite de detección= 90 ppb). En el caso del Cd, se obtuvieron valores en el 69% (n= 9) de las muestras, mientras que en el caso del Zn, únicamente fue posible detectar valores en el 15% (n= 2). Es posible que la no detección de Zn en la mayoría de las muestras de plasma se haya debido al volumen insuficiente de muestra, ya que para la mayoría de ellas se disponía de 0.5–1 ml de plasma sanguíneo. Para corroborar esto, se tomaron 3 ml de plasma de un individuo macho adulto (ejemplar 508), del cual se obtuvo la mayor cantidad de plasma (7 ml). Se analizó la concentración de Zn con 1 y 2 ml de plasma y se obtuvieron resultados únicamente para el volumen de 2 ml. El análisis también se repitió con 2 ml de plasma del ejemplar 507, en el cual también se detectó dicho metal. Debido a que no existió suficiente plasma en las muestras restantes, fue imposible

repetir el análisis. En cuanto al Hg se detectaron valores en el 46% (n= 6) de las muestras analizadas. Finalmente, se detectaron MTs en el 92% (n= 12) de las muestras. Los valores promedio para Cd fueron de 7.6 ± 9.6 ng/ml, para Zn 430.5 ± 444.1 ng/ml, para Hg 12.2 ± 9.2 ng/ml y para MTs $10\ 900 \pm 9\ 400$ ng/ml (Tabla 1).

5.2.2. Crestas caudales

De un total de 24 muestras, para el caso del Hg se detectaron valores en el 83% (n= 20). Debido a la poca cantidad de tejido en crías y algunos juveniles, únicamente fue posible analizar muestras de 13 cocodrilos para Cd, Cu, Zn y MTs, de las cuales, como ocurrió con el plasma, no se obtuvieron valores detectables para Cu (límite de detección= 90 ppb). Para Cd se obtuvieron valores en el 85% (n= 11) de las muestras y, para Zn solamente se detectaron valores en el 54% (n= 7). No se obtuvieron valores detectables para MTs. Las concentraciones promedio para Cd fueron de 31.7 ± 39.4 ng/g, para Zn 1496.4 ± 1366.9 ng/g y para Hg 374.1 ± 429.4 ng/g (Tabla 2).

Tabla 1. Concentraciones de cadmio (Cd), mercurio (Hg), zinc (Zn) y MTs (ng/ml; peso húmedo) detectadas en plasma sanguíneo de *C. moreletii* en el río Hondo.

Ejemplar	Cd	Hg	Zn	MTs	LT (m)	Peso (Kg)	Clase de edad	Sexo	Transecto de Captura
494	38.5	<2.3	<90	11 800	0.73	0.8	Juvenil	Macho	San Rafael de Pucté
495	5.30	<2.3	<90	30 400	0.985	2.5	Juvenil	Macho	San Rafael de Pucté
496	4.35	<2.3	<90	14 800	1.33	6.3	Subadulto	Hembra	San Rafael de Pucté
507	8.59	29	116.4	2000	1.76	20	Adulto	Hembra	San Rafael de Pucté
508	7.11	11	744.5	23 900	1.905	28	Adulto	Macho	San Rafael de Pucté
486	8.97	<2.3	<90	19 100	1.22	4.3	Subadulto	Macho	Cocoyol
491	6.05	<2.3	<90	<700	1.03	2.9	Subadulto	Hembra	Cocoyol
497	5.20	<2.3	<90	9 200	0.64	0.7	Juvenil	Hembra	La Unión
498	<3.9	<2.3	<90	14 300	0.994	2.7	Juvenil	Hembra	La Unión
499	<3.9	4	<90	4 500	1.069	3.3	Subadulto	Macho	La Unión
502	<3.9	14	<90	3 900	1.134	3.9	Subadulto	Macho	La Unión
503	<3.9	4	<90	800	1.36	6.4	Subadulto	Hembra	La Unión
504	6.76	11	<90	6 200	1.255	4.8	Subadulto	Macho	La Unión

LT = Longitud Total.

Límites de detección: 2.3 ppb (partes por billón) para Hg, 3.9 ppb para Cd, 90 ppb para Zn y 70 ppb para MTs.

Tabla 2. Concentraciones de cadmio (Cd), mercurio (Hg) y zinc (Zn) (ng/g; peso húmedo) detectadas en crestas caudales de *C. moreletii* en el río Hondo.

Ejemplar	Cd	Hg	Zn	LT (m)	Peso (Kg)	Clase de edad	Sexo	Transecto de Captura
492	NA	435	NA	0.335	-	Cría	Indeterminado	San Rafael de Pucté
493	NA	330	NA	0.337	0.062	Cría	Hembra	San Rafael de Pucté
494	NA	359	NA	0.73	0.8	Juvenil	Macho	San Rafael de Pucté
495	10.23	<2.3	<90	0.985	2.5	Juvenil	Macho	San Rafael de Pucté
496	4.34	5	3985.2	1.33	6.3	Subadulto	Hembra	San Rafael de Pucté
505	NA	51	NA	0.37	0.08	Cría	Indeterminado	San Rafael de Pucté
506	NA	<2.3	NA	0.43	0.22	Cría	Hembra	San Rafael de Pucté
507	17.07	298	2129	1.76	20	Adulto	Hembra	San Rafael de Pucté
508	15.01	347	<90	1.905	28	Adulto	Macho	San Rafael de Pucté
485	NA	348	NA	0.72	0.78	Juvenil	Macho	Cocoyol
486	144.3	134	261	1.22	4.3	Subadulto	Macho	Cocoyol
487	NA	<2.3	NA	0.288	0.03	Cría	Macho	Cocoyol
488	26.11	290	2239.9	1.21	4.7	Subadulto	Macho	Cocoyol
489	NA	<2.3	NA	0.32	0.06	Cría	Hembra	Cocoyol
490	<3.9	120	1008.3	1.507	11	Subadulto	Macho	Cocoyol
491	<3.9	272	<90	1.03	2.9	Subadulto	Hembra	Cocoyol
497	NA	382	NA	0.64	0.7	Juvenil	Hembra	La Unión
498	53.50	15	483	0.994	2.7	Juvenil	Hembra	La Unión
499	25.56	334	<90	1.069	3.3	Subadulto	Macho	La Unión
500	NA	2048	NA	0.51	0.31	Juvenil	Macho	La Unión
501	NA	269	NA	0.32	0.13	Cría	Indeterminado	La Unión
502	19.72	292	<90	1.134	3.9	Subadulto	Macho	La Unión
503	18.37	380	<90	1.36	6.4	Subadulto	Hembra	La Unión
504	14.18	773	368.4	1.255	4.8	Subadulto	Macho	La Unión

NA = No analizado. LT = Longitud total.

Límites de detección: 2.3 ppb para Hg, 3.9 ppb para Cd y 90 ppb para Zn.

5.3. Análisis Estadísticos

Debido a que el Cu se situó por debajo de su límite de detección en todas las muestras de plasma y crestas caudales, no fue posible incluirlo en el análisis estadístico. Asimismo, el Zn en el plasma tampoco fue considerado para dichos análisis, ya que únicamente se obtuvieron dos valores por encima de su límite de detección. En cambio, el Zn en las crestas presentó más del 50% de sus valores por encima de dicho límite, razón por la cual fue considerado para el análisis. En el caso del Hg y Cd, el 40% de los datos en las muestras de plasma presentaron valores por debajo de su límite de detección, por lo cual ambos elementos se incluyeron en el análisis. Del mismo modo, se realizó el análisis de Hg y Cd en las crestas caudales considerando que solamente el 15% de los datos presentaron valores por debajo de su límite de detección. En el caso de las MTs, solamente un 8% de los datos en plasma presentaron valores por debajo de su límite de detección, mientras que todas las muestras de crestas se situaron por debajo dicho límite. Por tanto, para fines estadísticos, se asignó la mitad del límite de detección, como valor para aquellos datos que se encontraron por debajo de dicho límite (Rainwater et al., 2007).

5.3.1. Metales pesados en plasma sanguíneo

Para fines del análisis estadístico, se tomaron en cuenta todos los datos ($n= 13$) de Cd y Hg, incluyendo aquellos por debajo del límite de detección, a los cuales se les asignaron los valores ya mencionados. Por lo anterior, se observó que existen correlaciones positivas significativas ($p < 0.05$) entre la concentración de Hg en el plasma de los cocodrilos y su longitud total (LT) ($r= 0.67$), longitud hocico-cloaca (LHC) ($r= 0.65$) y el peso de los individuos ($r= 0.65$). No se observaron relaciones significativas entre el Cd y la longitud o peso de los individuos.

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de Cd de los individuos en los tres transectos muestreados ($p= 0.047$; Fig. 5), siendo San Rafael de Pucté significativamente mayor, en tanto que para Hg no se obtuvieron diferencias significativas entre transectos. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre la concentración de Hg y las clases de edad (juveniles, subadultos y adultos) ($p= 0.04$; Fig. 6) siendo significativamente mayores en adultos, mientras que no se encontraron diferencias significativas para Cd. En cuanto a la relación entre la concentración de metales y el sexo de los individuos, no se obtuvieron diferencias significativas.

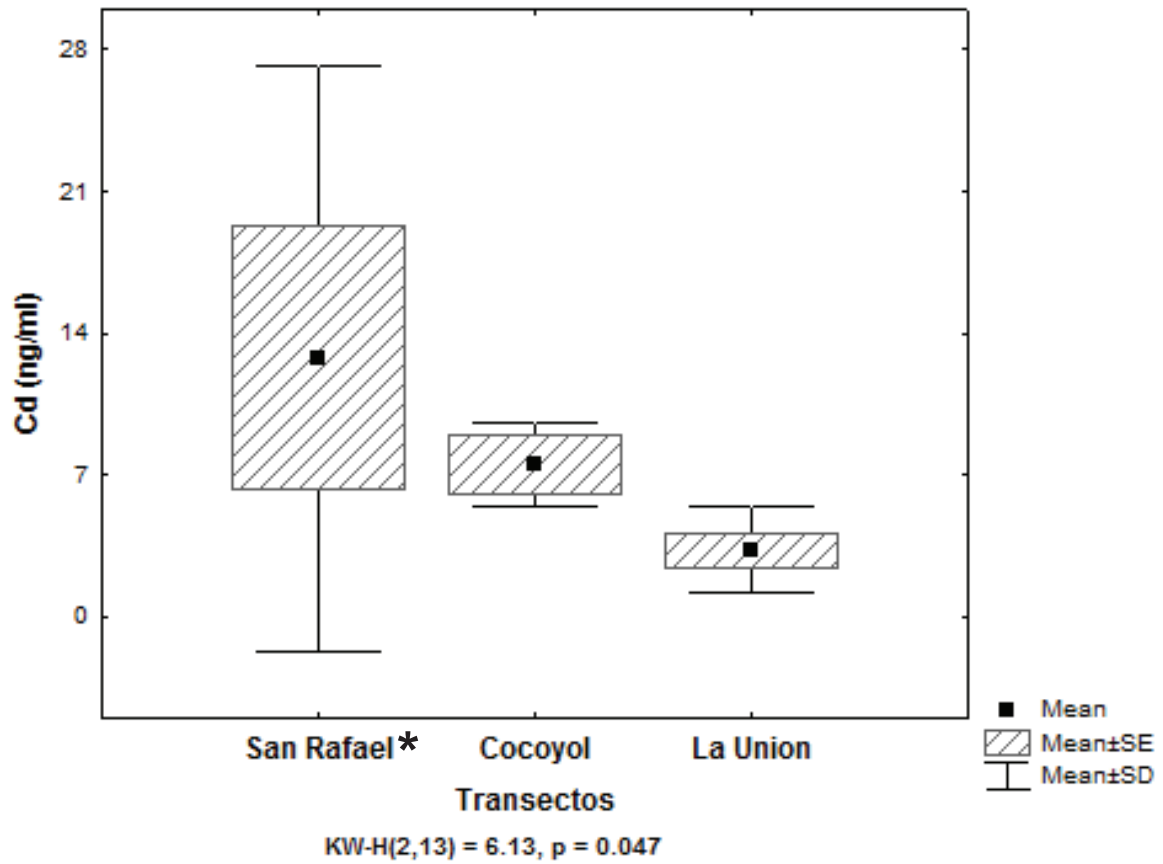


Figura 5. Variación en la concentración de cadmio (Cd) en el plasma sanguíneo de *C. moreletii* (n= 13) por transectos muestreados. *Diferencia significativa en San Rafael de Pucté.

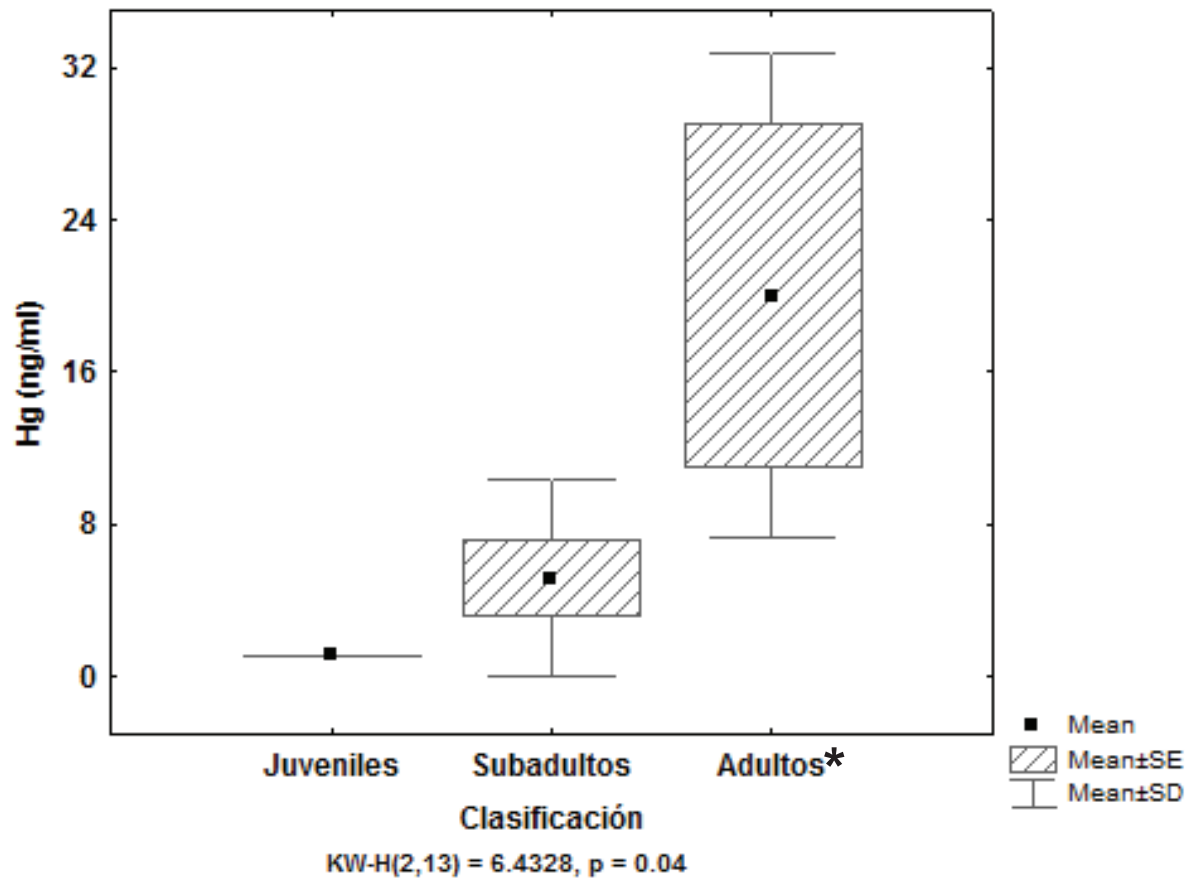


Figura 6. Variación en la concentración de mercurio (Hg) en plasma sanguíneo de *C. moreletii* (n= 13) por clases de edad. *Diferencia significativa en adultos.

5.3.2. Metales pesados en crestas caudales

Para probar si las concentraciones de Cd, Hg y Zn eran significativamente diferentes entre el plasma sanguíneo (n= 13) y las crestas caudales (Cd y Zn n= 13; Hg n= 24), se aplicó la prueba de Wilcoxon. Se observó que existen diferencias significativas para todos los metales ($p < 0.05$), siendo la concentración en las crestas caudales mayor que en el plasma (Fig. 7).

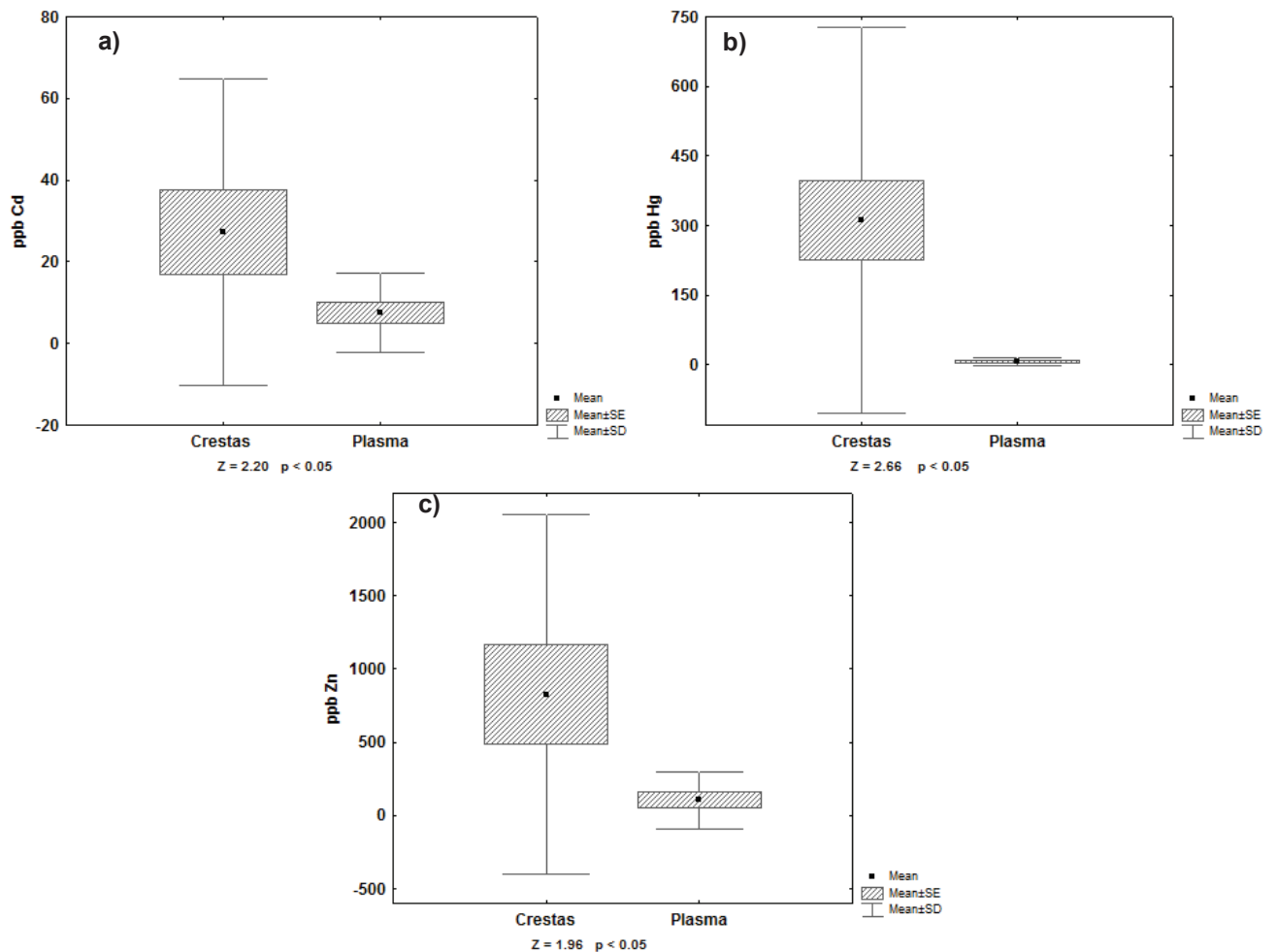


Figura 7. Comparación de la concentración de: a) cadmio (Cd); b) mercurio (Hg) y c) zinc (Zn) en crestas caudales y plasma sanguíneo de *C. moreletii*.

No se observaron relaciones significativas entre las concentraciones de metales en las crestas caudales y la longitud o peso de los individuos. En relación con las concentraciones de Hg entre los tres transectos muestreados, se observó que los cocodrilos del transecto La Unión presentaron la concentración promedio más alta con respecto a los otros dos transectos, que registraron concentraciones más bajas (con valores similares). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0994$; Fig. 8).

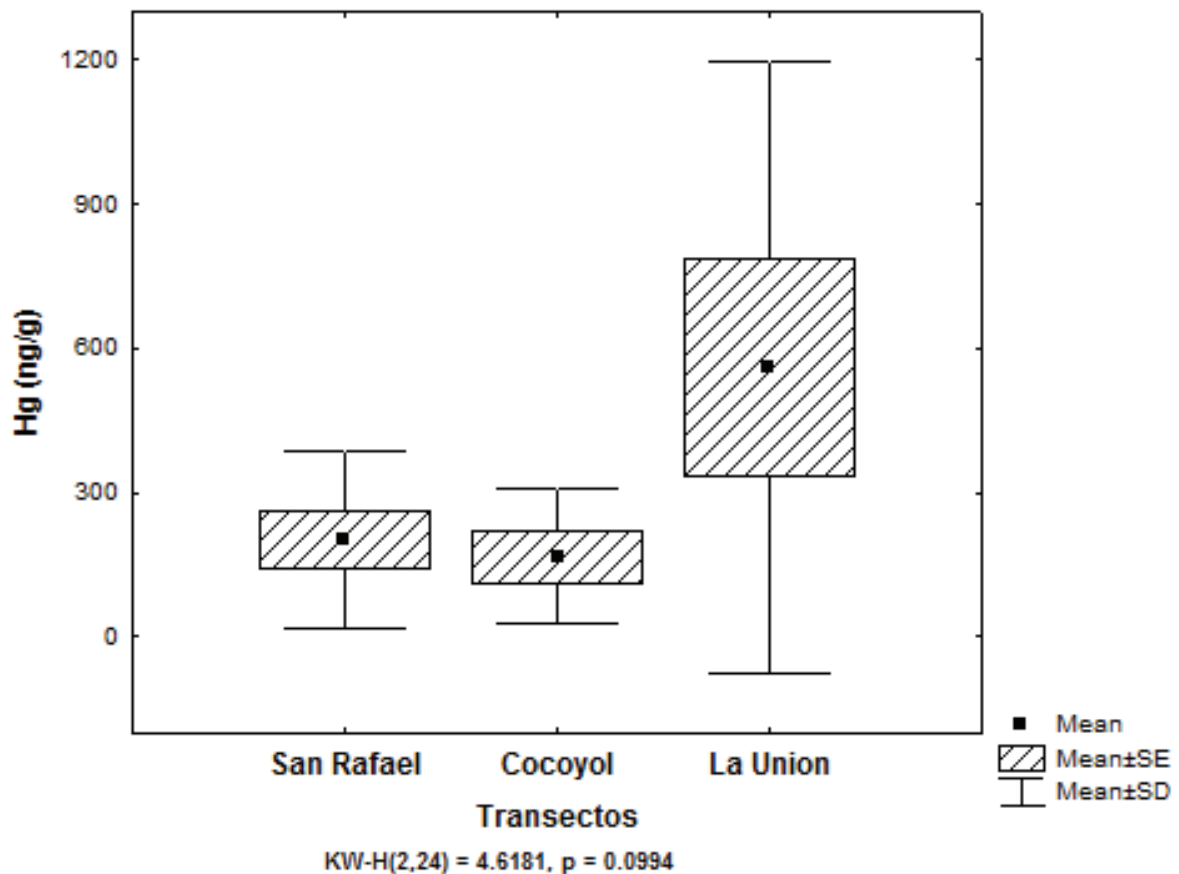


Figura 8. Variación en la concentración de mercurio (Hg) en crestas caudales ($n = 24$) de *C. moreletii* por transectos muestreados.

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de metales en crestas y las clases de edad de los cocodrilos. Sin embargo, se observó que, en promedio, los individuos juveniles presentaron mayor concentración de Cd y Hg (aunque para Cd, tanto juveniles como subadultos mostraron los mismos valores), mientras que en los adultos se encontró mayor concentración de Zn (Fig. 9).

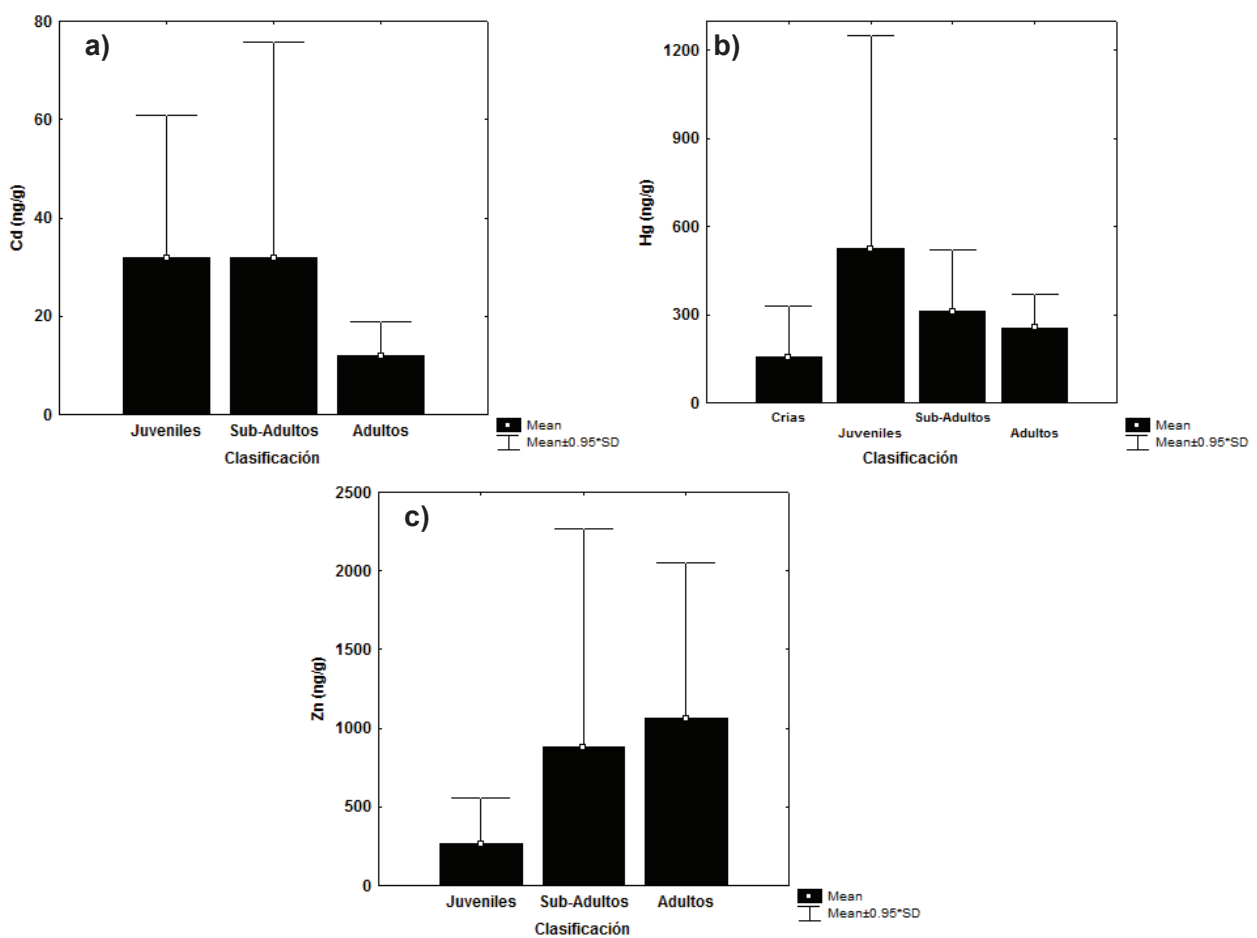


Figura 9. Concentraciones promedio de: a) cadmio (Cd), b) mercurio (Hg) y c) zinc (Zn) en crestas caudales de *C. moreletii* por clases de edad.

No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de metales en crestas de machos y hembras (n= 13). Tampoco se encontraron diferencias entre las concentraciones de metales en machos y hembras de cada transecto. Sin embargo, al analizar las concentraciones de metales entre machos y hembras en cada clase de edad, sí se obtuvieron diferencias significativas entre la concentración de Cd en machos y hembras subadultos ($Z = -1.93$, $p = 0.05$; Fig. 10).

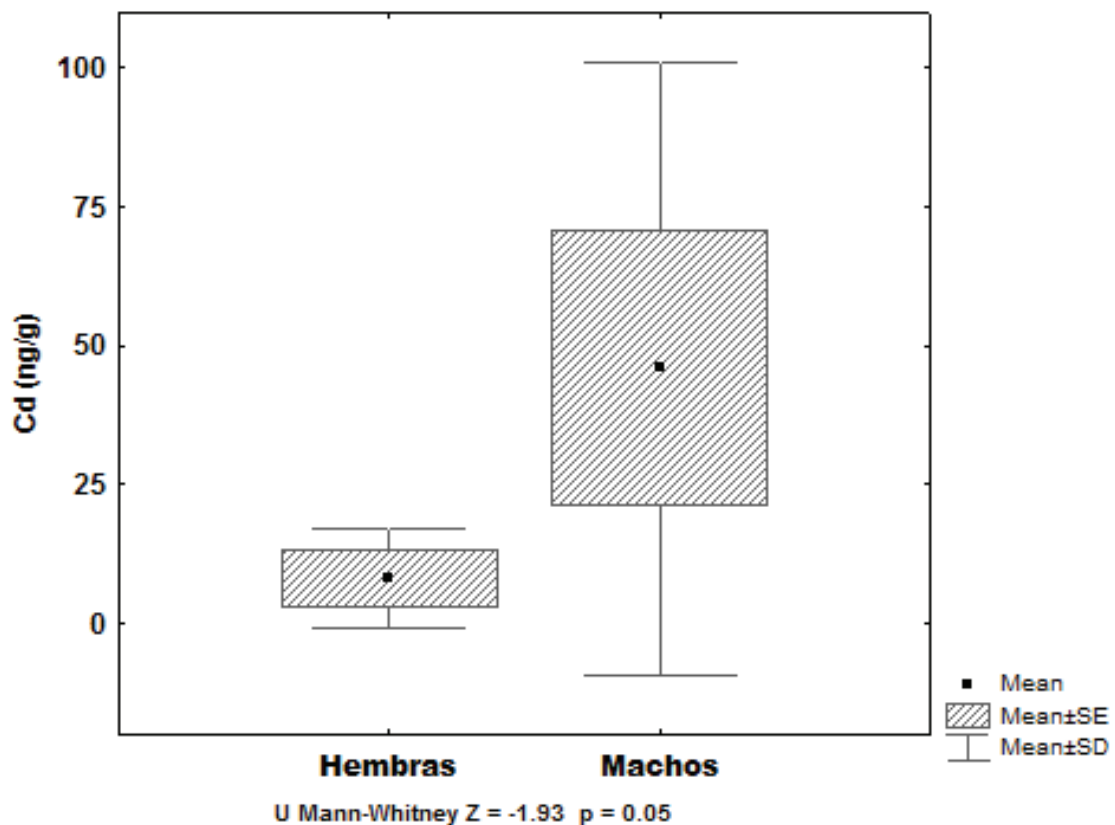


Figura 10. Variación en la concentración de cadmio (Cd) en crestas caudales de subadultos de *C. moreletii* (n= 9) por sexo.

5.3.3. Metalotioneínas en plasma sanguíneo

Como no se obtuvieron valores de MTs en crestas, sólo fue considerado este parámetro en plasma sanguíneo. Para el análisis, únicamente se consideró al Cd y Hg, ya que sólo se obtuvieron dos valores para Zn.

No se observaron relaciones significativas entre la concentración de MTs y metales, ni la LT o peso de los individuos (n= 13). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las MTs en los tres transectos muestreados, ni entre las concentraciones de MTs en cada clase de edad (n= 13).

Debido a que el tamaño de muestra por cada clase de edad no fue uniforme, no fue posible correlacionar las concentraciones de metales y MTs de juveniles, subadultos y adultos. Sin embargo, se observó una tendencia entre las concentraciones promedio de Cd y MTs (Fig. 11a), lo cual no se observó con el Hg (Fig. 11b).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de MTs por sexo de los individuos (n= 13). Tampoco se observaron relaciones entre la concentración de metales y MTs en machos (n= 7) y hembras (n= 6).

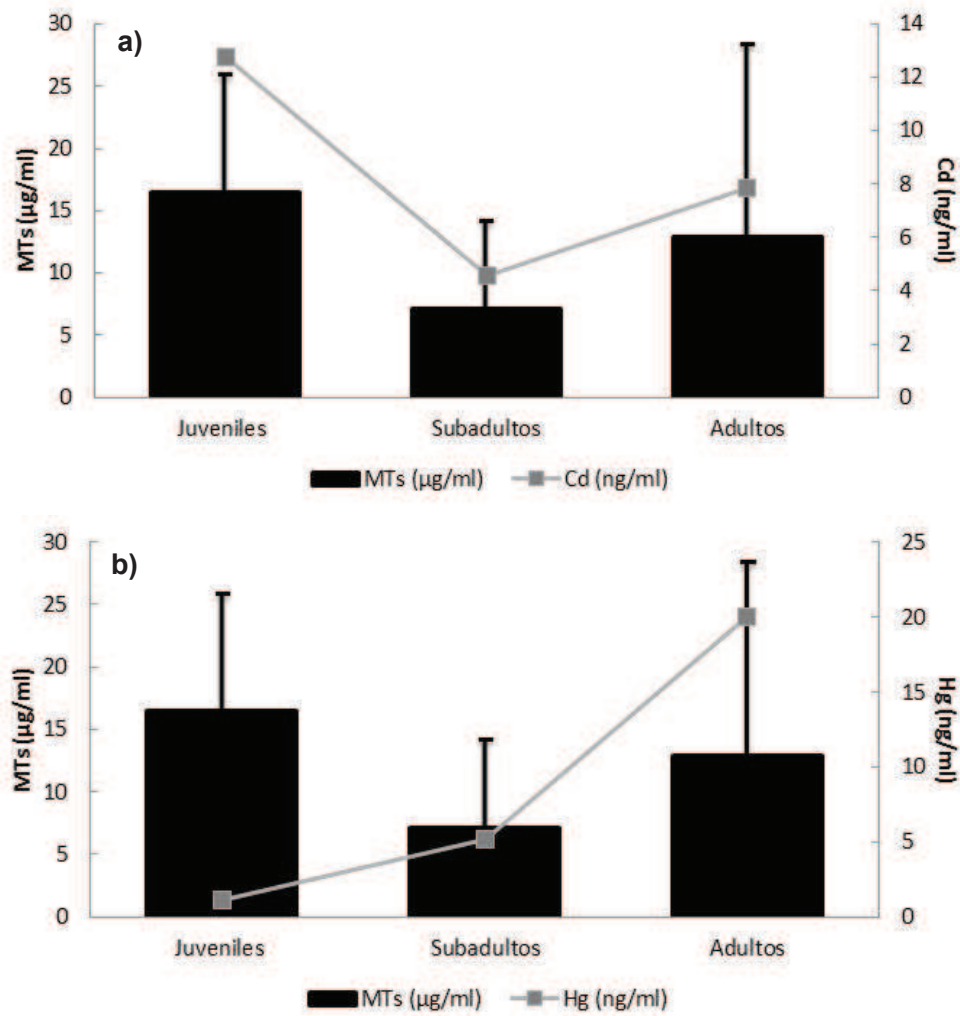


Figura 11. Concentraciones promedio de Cd y MTs (\pm SD) (a) y Hg y MTs (\pm SD) (b) en plasma sanguíneo de *C. moreletii* por clases de edad.

6. DISCUSIÓN

6.1 Biomarcadores de exposición

6.1.1. Plasma sanguíneo

El Zn y el Cu son elementos esenciales para los seres vivos; incluso, durante muchos años se han documentado los requerimientos nutricionales mínimos en diferentes especies por su gran importancia en múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos (Lance et al., 1995; Kolf-Clauw et al., 2007). Por esta razón, su deficiencia o exceso en la sangre se considera como un riesgo para la salud (Kolf-Clauw et al., 2007).

Existe información muy limitada acerca de los rangos normales de Zn en fracciones sanguíneas de reptiles y únicamente un estudio documentó que los rangos normales de Zn en plasma sanguíneo de cocodrilianos se encuentra entre 0.1–0.9 ppm (partes por millón) (Lance et al., 1995). Asimismo, otro estudio documentó que estos organismos son capaces de subsistir con 3 ppm de Zn en plasma sanguíneo, sin presentar síntomas de toxicidad (Cook et al., 1989). En el caso del Cu, aunque también es un elemento esencial, su participación en procesos bioquímicos es mucho menor que la del Zn. Generalmente el Cu se encuentra en mayor proporción en los eritrocitos y en menor medida ligado a proteínas del plasma para ser transportado a otros tejidos como huesos, hígado y músculos (Eisler, 1998). Beck (1956) reportó valores de Cu en sangre de distintas especies de vertebrados en un rango de 0.5–1 ppm, aunque no se ha establecido un rango en fracciones sanguíneas en reptiles (Brambila-Colombres y Lozano-Zarain, 1999). Aunque es posible que la mayor parte del Cu se concentre en los

eritrocitos, el interés de esta investigación era evaluar la concentración de metales en el plasma sanguíneo para así poder correlacionarlo con las MTs.

En el presente estudio, las únicas muestras con valores detectados de Zn provienen de cocodrilos adultos y ambas se encuentran dentro del rango mencionado en plasma sanguíneo; mientras que el Cu no fue detectado en ninguna muestra. Por tanto, es posible que la no detección de Zn en juveniles y subadultos, y la no detección del Cu se deba a que la cantidad de muestra empleada (0.5–1 ml), fue insuficiente para presentar valores detectables con el método de aspiración directa (absorción atómica con detector de flama), el cual mide concentraciones en ppm ($\mu\text{g/ml}$). Por consiguiente, para el análisis de Cu y Zn con este método, es necesario emplear por lo menos 2 ml de plasma en el análisis, o de no contar con un volumen mayor a 1 ml, realizar el análisis con detectores de mayor sensibilidad como ICP-OES o ICP-MS, que pueden detectar concentraciones en partes por trillón (ppt; pg/ml).

En el caso del Cd y el Hg, su sola presencia en el organismo se considera un potencial riesgo para la salud, ya que son metales xenobióticos (no esenciales) altamente tóxicos; por ello, su ausencia en los organismos no se considera de vital importancia, como en el caso de los metales fisiológicos (Cu y Zn) (Kolf-Clauw et al., 2007). En el presente estudio, las concentraciones de Cd y Hg en plasma sanguíneo fueron detectadas con los accesorios horno de grafito y generador de hidruros, respectivamente. Éstos son capaces de detectar concentraciones en ppb, por lo cual, las concentraciones por debajo del límite de detección en el presente estudio indican que posiblemente para esas muestras en particular, el Cd y el Hg se encuentran en

concentraciones aún menores (ppt), las cuales no pueden detectarse con dichos accesorios.

La presencia del Cd en el plasma sanguíneo es considerada como un indicador de exposición reciente, ya que estudios toxicológicos han corroborado que, al comienzo de la exposición, el valor de Cd en la sangre es alto y no depende de la carga corporal; es decir, la cantidad total del elemento antes de ser excretado (Shaikh & Smith, 1984; López-Artíguez y Repetto, 1995). Esto podría haber ocurrido con el ejemplar 494 (individuo juvenil macho), ya que en particular, presentó una concentración de 39 ppb de Cd, mientras que presentó concentraciones por debajo del límite de detección para los otros metales. Este individuo fue capturado en San Rafael de Pucté, en un dren pluvial cercano a una zona con alta incidencia de agroquímicos, por lo cual, es posible que dicho individuo haya estado expuesto al Cd poco antes de la colecta. En cambio, el resto de los cocodrilos presentaron concentraciones de Cd menores a 9 ppb. Esto podría representar una exposición crónica, ya que se ha documentado que al interrumpirse la exposición, la concentración de Cd en la sangre depende en mayor medida de la carga corporal y la eliminación del Cd se torna lenta (7–16 años) (López-Artíguez y Repetto, 1995). Por tanto, para discernir si la exposición en los cocodrilos del río Hondo es reciente o crónica, sería necesario evaluar los niveles de Cd en la orina, ya que la presencia de dicho metal en este fluido es un indicador de exposición crónica (López-Artíguez y Repetto, 1995).

En el caso del Hg, las concentraciones detectadas en el plasma son directamente proporcionales a la LT, la LHC y el peso de los individuos. Esto podría indicar que, la

acumulación de Hg en los cocodrilos depende de su edad y que la exposición a este metal es continua. Cabe mencionar que las concentraciones de Hg obtenidas en este estudio (4–29 ng/ml) se encuentran dentro de los valores reportados para otras especies de fauna silvestre (<50 ng/ml) como aves, mamíferos y reptiles (Lehner et al., 2013). Estudios en serpientes acuáticas (*Nerodia sipedon*) indican que las concentraciones de Hg en sangre de estos organismos es directamente proporcional a su acumulación en los tejidos internos (hígado, riñones y músculo) (Burger et al., 2005). Incluso se ha demostrado que las concentraciones de Hg en sangre, se relacionan directamente con la carga corporal de Hg; si la exposición es continua, se convierte en una carga corporal persistente (Burger et al., 2005). Considerando que la concentración en plasma fuera proporcional a la concentración en tejidos internos (Burger et al., 2005), es probable que el Hg en plasma represente una carga corporal persistente. Por tanto, para discernir si se trata de una exposición reciente o crónica, es necesario evaluar en conjunto las concentraciones de Hg en fracciones sanguíneas y tejidos internos en los cocodrilos.

Los mayores valores de Hg registrados en el plasma sanguíneo de los individuos adultos, mostraron que posiblemente existe una correlación entre la concentración de este metal y la talla de los cocodrilos. Sin embargo, se debe considerar que las diferencias obtenidas podrían estar condicionadas por la disparidad entre el número de individuos por clases de edad (4 juveniles, 7 subadultos y 2 adultos). Aunque las concentraciones de Hg se encuentran dentro de los valores reportados en reptiles (Lehner et al., 2013), los efectos biológicos y genéticos del Hg en estos organismos no

han sido documentados (Schneider et al., 2012); por ende, se desconocen los efectos que las concentraciones crónicas de Hg podrían ejercer a largo plazo. Además, se debe considerar también que los cocodrilianos poseen una gran capacidad de acumulación de Hg, sin que éstos necesariamente manifiesten efectos tóxicos, tales como demacración, patologías, malformaciones y coordinación motora anormal (Peters, 1983; Rainwater et al., 2002).

Debido a que no se ha reportado presencia de metales pesados en plasma sanguíneo de cocodrilianos, se compararon los datos obtenidos con estudios en sangre de otros reptiles, especialmente los quelonios (Tabla 3). Si bien, dichos organismos no presentan rangos de concentraciones de metales fisiológicos tan elevados como los de las serpientes y los saurios, se debe tomar en cuenta que los rangos en quelonios pueden ser hasta 8 veces mayores que en los cocodrilianos (0.7 – 11 ppm) (Lance et al., 1995). En general, las concentraciones obtenidas en los cocodrilos del río Hondo son relativamente menores, lo cual indica que su exposición a estos metales es menor en la cuenca del río Hondo.

Tabla 3. Concentraciones promedio de metales pesados (ppb; peso húmedo) detectadas en sangre de reptiles en la literatura y en plasma sanguíneo *C. moreletii* del presente estudio.

Área de estudio	Organismo	N	Mercurio	Cadmio	Zinc	Cobre	Referencia
Tennessee (Estados Unidos)	<i>N. sipedon</i> (Serpiente)	46	407 ^a	7 ^a	NA	NA	Burger et al., 2005
Curtis Island (Australia)	<i>N. depressus</i> (Quelonio)	20	<LD ^a	<LD ^a	151 ^a	8 ^a	Ikonomopoulou et al., 2011
Yamalipo beach (Guyana Francesa)	<i>D. coriacea</i> (Quelonio)	78	11 ^a	80 ^a	11 100 ^a	1 340 ^a	Guirlet et al., 2008
Massachusetts (Estados Unidos)*	<i>L. kempii</i> (Quelonio)	16	24 ^a	<LD ^b	2290 ^b	690 ^b	Innis et al. 2008
Río Hondo (Quintana Roo)	<i>C. moreletii</i> (Cocodrilo)	13	12 ^b	8 ^b	431 ^b	<LD ^b	Presente estudio

<LD = Valor por debajo del límite de detección. NA = No analizado.

^a Análisis en sangre total; ^b Análisis en plasma sanguíneo.

6.1.2. Crestas caudales

Si bien se obtuvieron 24 crestas caudales, las muestras obtenidas en ejemplares <60 cm (n= 11) fueron insuficientes para analizar todos los metales. Por ende, se seleccionó el análisis de Hg para estas muestras en particular, debido a que este metal es altamente tóxico para los organismos. Por tal motivo, este fue el único metal analizado en crías.

Los resultados obtenidos en el análisis de las crestas caudales indican que los cocodrilos han estado expuestos a metales pesados y que los están acumulando en sus tejidos. Algunos estudios sugieren que los cocodrilianos tienden a eliminar metales pesados a través de los tejidos externos (crestas) (Heaton-Jones et al., 1997; Jagoe et al., 1998; Burger et al., 2005). Burger et al. (2000) mencionaron que existe una fuerte correlación entre crestas y tejidos internos en *Alligator mississippiensis*; esto indica que las altas concentraciones de Cd y Hg en juveniles, así como de Zn en adultos, podrían ser un reflejo de su acumulación en órganos internos.

La ausencia del Cu en las crestas de esta investigación podría deberse a que el equipo utilizado para el análisis solamente detecta estas concentraciones en ppm. Si bien, la cantidad de muestra utilizada para el análisis concuerda con lo reportado en la literatura (Burger et al., 2000; Jagoe et al., 1998; Rainwater et al., 2007), dichos estudios utilizaron equipos capaces de detectar concentraciones en ppb. Por consiguiente, es recomendable utilizar detectores de mayor sensibilidad, preferentemente de ppt.

En general, las concentraciones de Hg, Cd y Zn obtenidas en este trabajo son mayores que las de ejemplares de *C. moreletii* en Belice, lo cual indica que la exposición a estos metales es mayor en el río Hondo. Otro estudio en *C. moreletii* en Campeche en ejemplares en vida libre presentó mayores concentraciones de Hg que los organismos de la cuenca del río Hondo, aunque los cocodrilos que habitaban sistemas lagunares presentaron concentraciones más bajas (Trillanes-Flores, 2013) (Tabla 4). Si bien la diferencia de concentraciones de Hg en crestas caudales entre los transectos no es significativa, gráficamente se observa que las concentraciones en las muestras de La Unión (561.63 ± 224.73 ng/g) son mayores que las obtenidas en los otros transectos del río Hondo y en Orange Walk, Belice (98.7 ± 21.6 ng/g) (Rainwater et al., 2007). Esto indica que probablemente las fuentes de Hg son mayores en La Unión, aunque se debe considerar que este metal puede estar presente en este transecto no solamente por la influencia de las zonas agrícolas y asentamientos humanos en México, sino también por las zonas agrícolas y la industria cañera de Belice (Magnon-Basnier, 2002).

Tabla 4. Concentraciones promedio de metales pesados (ng/g; peso húmedo) detectadas en crestas caudales de *C. moreletii* en la literatura y en el río Hondo.

Área de estudio	N	Mercurio	Cadmio	Zinc	Cobre	Referencia
Gold Button Lagoon (Orange Walk)	9	99	<LD	<LD	346	Rainwater et al., 2007
New River Watershed (Corozal/Orange Walk)	10	73	71	<LD	452	Rainwater et al., 2007
Río Champotón (Campeche)	7	829	<LD	NA	NA	Trillanes-Flores, 2013
Mocú-Silvituc (Campeche)	6	182	<LD	NA	NA	Trillanes-Flores, 2013
Petenes-Celestún (Campeche)	10	1155	<LD	NA	NA	Trillanes-Flores, 2013
San Rafael de Pucté	9	261	12	3057	<LD	Presente estudio
Cocoyol	7	233	85	1170	<LD	Presente estudio
La Unión	8	562	26	426	<LD	Presente estudio

<LD = Valor por debajo del límite de detección. NA = No analizado.

*Los resultados de Trillanes-Flores (2013) se convirtieron en base húmeda utilizando el factor de relación 3.8 (peso húmedo/seco) calculado en crestas caudales por Jeffree et al. (2001).

Es posible que los cocodrilos adultos del río Hondo presenten mayor acumulación de Zn por la descarga de aguas residuales de las zonas agrícolas y los asentamientos humanos. No obstante, aunque en menor medida, los cocodrilos podrían estar ingiriendo alimento con altas concentraciones de Zn, mismas que podrían acumularse en el tejido epidérmico (crestas caudales). En general, es común que los individuos adultos presenten mayores concentraciones de Zn (Jeffrey et al., 2001), especialmente las hembras en periodo reproductivo (Lance et al., 1995). No obstante, en raras ocasiones se han reportado altas concentraciones de Zn debido a la ingesta accidental de objetos que contienen dicho metal, que eventualmente los organismos no logran eliminar (Lance et al., 1995). Rainwater et al. (2007) no reportaron concentraciones de Zn en los individuos analizados en Belice (n= 19) y refirieron que no se han documentado fuentes probables de contaminación por Zn en la zona.

Las diferencias entre las concentraciones de Cd en las crestas de machos y hembras subadultos de *C. moreletii*, sugieren que los machos almacenan mayores cantidades de Cd que las hembras. Nordberg y Nordberg (2009) mencionaron que cuando un organismo presenta deficiencias de metales fisiológicos, especialmente hierro (Fe), este compensa las deficiencias absorbiendo en mayor cantidad metales tóxicos, particularmente Cd. Por ende, es posible que los machos presenten deficiencias de metales fisiológicos y que por esta razón acumulen una mayor cantidad de Cd. En cambio, es posible que las hembras en esta etapa de su vida, al estar alcanzando la madurez sexual (Casas-Andreu et al, 2011), absorban menos Cd debido a que, en etapa reproductiva, la absorción de metales fisiológicos aumenta considerablemente

(Lance et al., 1995; Nordberg y Nordberg, 2009). Sin embargo, debido al tamaño reducido de juveniles y adultos, se desconoce si existen diferencias significativas en estas clases de edad. Por tanto, para establecer una mejor conclusión, sería necesario un tamaño de muestra similar entre clases de edad.

6.1.3. Fuentes potenciales de metales pesados en *Crocodylus moreletii*

Existen diversos factores por los cuales el Cd y Hg podrían estar presentes en el área de estudio. Éstos podrían ser los asentamientos humanos, las actividades agrícolas y la industria azucarera de México y Belice (Magnon-Basnier, 2002), ya que entre los tres transectos de muestreo existen diferencias de concentraciones entre el Cd del plasma sanguíneo y el Hg de las crestas caudales. Cisneros et al. (2011) realizaron un estudio en el ingenio azucarero Casasano, Morelos, en el cual demostraron que las descargas de aguas residuales emitidas por dicho ingenio contenían Cd, Cu, Hg y Zn. Si bien no existen referencias de metales pesados en las descargas de los ingenios de ambos países, es probable que la industria azucarera de la cuenca del río Hondo emita también metales pesados en sus descargas residuales.

Es posible que los ejemplares analizados hayan sido expuestos a mayores concentraciones en el transecto de San Rafael de Pucté al momento de colectar las muestras. Como se observa en la figura 12, en dicho transecto se tiene la influencia de una mayor cantidad de asentamientos humanos, así como de una amplia zona de uso agrícola; además, la refinería azucarera Beta San Miguel se ubica en la localidad Javier Rojo Gómez. Durante el recorrido se localizó un dren pluvial y cerca del mismo se encontró una bodega de insecticidas y fertilizantes, así como distintas cooperativas

agrícolas (Fig. 12a). Cabe mencionar que la mayoría de los cocodrilos capturados en ese transecto se encontraban aledaños a la sabana inundable donde se ubica dicho dren. Por lo antes mencionado, es posible que exista una alta incidencia de desechos de la industria azucarera, agroquímicos y descargas directas de aguas residuales provenientes de las comunidades rurales (Euán-Ávila et al., 2002), lo cual podría estar aportando metales pesados al sistema.

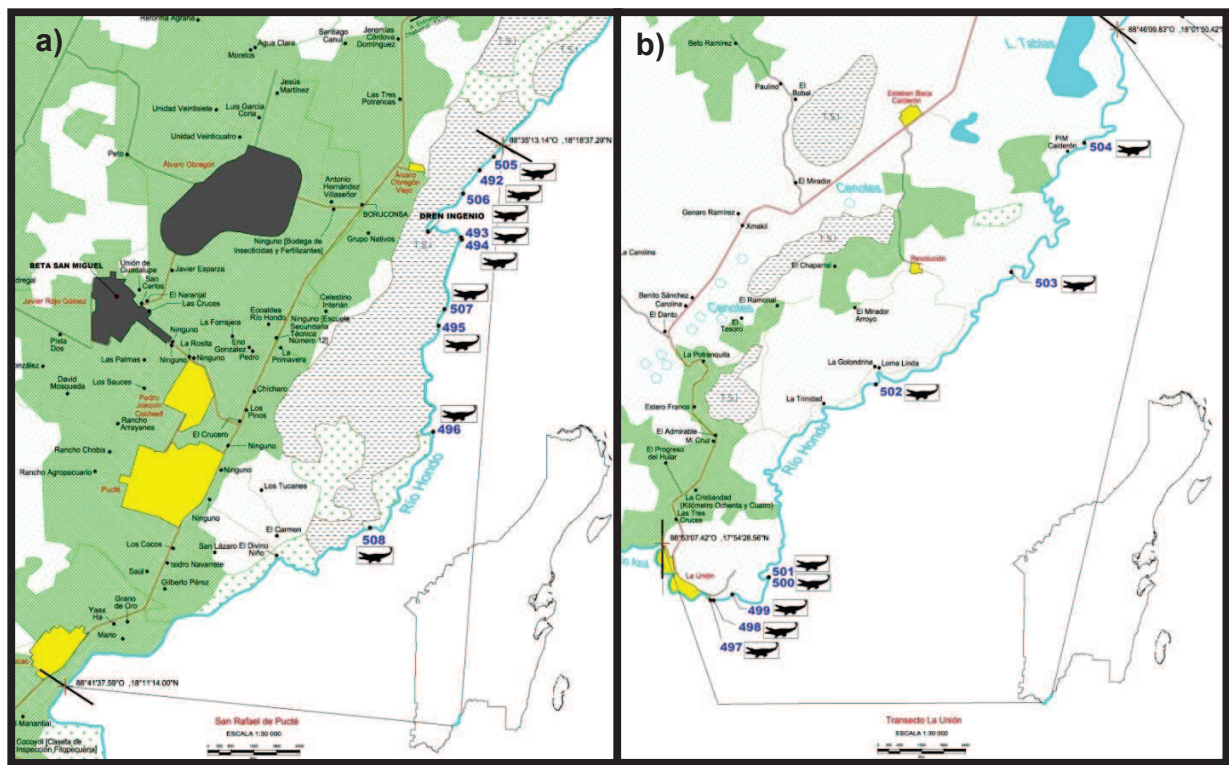


Figura 12. Comparación entre los transectos San Rafael de Pucté (a) y La Unión (b). Se muestra la ubicación de los asentamientos humanos, la distribución de los diferentes usos de suelo (INEGI, 2013) y la ubicación de los ejemplares capturados. T.S.I. = Terreno sujeto a inundación; área color verde = zona agrícola.

En cuanto al Hg, aunque la influencia de asentamientos humanos, así como las zonas de uso de suelo agrícola en La Unión son menores en proporción con San Rafael de

Pucté, la mayoría de los ejemplares fueron capturados cerca de poblados (Fig. 12b), por lo cual, las descargas directas de aguas residuales podrían ser una posible fuente de dicho metal. No obstante, el aporte de Hg podría también deberse a la contaminación proveniente de las zonas agrícolas de Belice (Magnon-Basnier, 2002), así como a deposiciones atmosféricas naturales (Rainwater et al., 2002). En el caso de Cocoyol, no existe una gran influencia de asentamientos humanos, ni zonas agrícolas, lo cual podría explicar las menores concentraciones de metales con respecto a los otros dos transectos.

En particular, dos ejemplares capturados en Cocoyol y La Unión presentaron altas concentraciones de Cd y Hg en las crestas, respectivamente. Si bien Cocoyol y La Unión no presentan una gran cantidad de fuentes de metales en México, se ha documentado que el río Booth en Belice, el cual desemboca entre los transectos Cocoyol y La Unión, podría aportar metales pesados al río Hondo debido al uso intenso de agroquímicos provenientes de los campos de cultivo de los menonitas de Blue Creek (Magnon-Basnier, 2002).

El ejemplar 486 (macho subadulto) colectado en Cocoyol, presentó las más altas concentraciones de Cd (145 ppb). Es posible que esto se deba a que los machos subadultos almacenaron mayor cantidad de este metal, de acuerdo con el análisis estadístico de diferencias significativas entre machos y hembras subadultos. Además, este cocodrilo en particular pudo haber absorbido una mayor cantidad por el aporte del río Booth, ya que en el caso de los otros ejemplares de Cocoyol, no se observaron altas

concentraciones de Cd y salvo este valor, las concentraciones más altas se encontraron en San Rafael de Pucté.

En el caso del Hg, el ejemplar 500 (macho juvenil) capturado en La Unión, presentó las más altas concentraciones de este metal (2048 ppb). Aunque no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de Hg en los transectos, ni en las clases de edad, se observó que las concentraciones en La Unión son mucho mayores y que los juveniles presentaron las concentraciones más altas de Hg. Posiblemente los juveniles absorben mayores cantidades de Hg y conforme este metal es absorbido en los órganos internos, se convierte en una carga corporal persistente (Burger et al., 2005). Sin embargo, en este ejemplar no se analizaron metales en plasma sanguíneo, por lo cual se requieren mayor cantidad de estudios en cocodrilos para corroborar si existe una exposición crónica a Hg en La Unión.

6.2. Metalotioneínas como biomarcadores de efecto

Los resultados obtenidos en el análisis de MTs indican que los cocodrilos del río Hondo presentan MTs en el plasma sanguíneo, pero no en las crestas caudales. Las concentraciones de MTs son mayores con respecto a las concentraciones de los metales obtenidos en el plasma. Esto podría deberse a que las MTs aparecen en el plasma sanguíneo mucho antes de que se manifiesten efectos de nefrotoxicidad; ya que una vez que los metales xenobióticos se encuentran en los tejidos de los organismos, las MTs ligan dichos metales para prevenir cualquier posible efecto tóxico (Shaikh & Hirayama, 1979; Amiard et al., 2006). Las altas concentraciones de complejos metal-MT en órganos internos tienden a retrasar la transferencia de metales

hacia la sangre; por ende, la concentración de MTs en plasma es mayor (Deb & Fukushima, 1999). Se debe considerar además que las MTs son capaces de ligar múltiples iones metálicos, por lo cual no solamente podrían estar regulando la toxicidad de metales xenobióticos, sino también la concentración de metales fisiológicos para así favorecer distintos procesos metabólicos en el organismo (Amiard et al., 2006). Igualmente, los metales en el plasma no solamente se ligan a las MTs, sino también a otras proteínas, como la albúmina y globulinas (Shaikh & Hirayama, 1979).

Las MTs no se correlacionaron con las concentraciones de metales pesados ni con las tallas de los cocodrilos. Además, tampoco se presentaron diferencias significativas entre clases de edad, sexos ni transectos. Al respecto, Nordberg y Nordberg (2009) señalaron que la función principal de las MTs en el plasma sanguíneo consiste en el transporte de complejos metal-MT hacia otros órganos. Por ende, la síntesis de MTs no se produce en el plasma sanguíneo, sino en respuesta a la presencia de Cd en el hígado. Dependiendo del tipo de exposición, la liberación de MTs en el torrente sanguíneo puede ser rápida (exposición reciente) o lenta (exposición crónica). Si existe una exposición crónica, la síntesis de MTs se vuelve continua. Por tanto, es probable que la concentración de MTs en los cocodrilos no dependa de su edad, sino del tipo de exposición. Esto podría corroborarse con un mayor tamaño de muestra, ya que si bien no se contó con diferencias estadísticamente significativas entre transectos, sí se observó una mayor concentración de MTs en San Rafael de Pucté con respecto a los otros dos transectos. Asimismo, si bien el análisis no resultó estadísticamente significativo, se observó una mayor concentración de MTs en los machos. Previamente se ha reportado que los organismos machos tienden a presentar mayores cantidades

de MTs que las hembras, aunque esta tendencia no ha sido claramente descrita hasta la fecha (Nordberg y Nordberg, 2009).

Es posible que el patrón observado con respecto al Cd y a las MTs sea debido a que estas podrían estar ligándose al Cd, obedeciendo a sus funciones de desintoxicación y que la síntesis de MTs es directamente inducida por dicho metal. En el caso del Hg, no se observó ninguna tendencia de concentración con respecto a las MTs. Chan et al. (1992) realizaron un ensayo controlado (7 días), en el cual inyectaron Cd, Hg y complejos Cd-MT y Hg-MT en ratas y encontraron que, tanto el Hg como el Hg-MT, inducen la síntesis de MTs únicamente en el riñón, a diferencia del Cd y Cd-MT, los cuales inducen la síntesis, tanto en el hígado (Cd) como en los riñones (Cd-MT). Además, los niveles de MTs en plasma sanguíneo se incrementaron después de 3 días de inyectar Cd, lo cual no ocurrió con las inyecciones de Hg. Estos hallazgos indican que la MT hepática influye significativamente en las concentraciones de MTs en el plasma sanguíneo, y que el Cd es el metal que induce la síntesis de MTs en el hígado. En el caso del Hg, este produce daños renales y no se sintetiza en el hígado, por lo cual la presencia de este metal en el plasma no es significativa, como en el caso del Cd (Chan et al., 1992).

Si bien, Santucci et al., (2000) demostraron que las MTs se sintetizan en la piel, en esta investigación no se encontraron MTs en las crestas caudales de *C. moreletii*. Esto podría deberse principalmente a que las MTs no se expresan en la piel, aunque también es posible que los tejidos de los cocodrilos no fueran suficientemente blandos para extraer correctamente el citosol de las crestas. Dobrovoljc et al. (2012) llevaron a

cabo un estudio en diferentes órganos de salamandras (*Necturus maculosus*) y sapos (*Bufo bufo*), en el cual constataron que, si bien existían concentraciones de Cd en la piel de ambos organismos, este no fue el caso para las MTs. Cabe señalar que ambas especies presentaron concentraciones de MTs en el hígado y riñones e incluso se detectó Cd-MT. Esto concuerda con los resultados en crestas caudales de los cocodrilos, por lo cual se infiere que los metales pesados se acumulan en las crestas, pero las MTs no se sintetizan en este tejido y por lo tanto, no se forman complejos metal-MT.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se reporta por primera vez la presencia de metales pesados y la síntesis de MTs en el plasma sanguíneo del cocodrilo de pantano, en respuesta a la exposición a metales pesados en el río Hondo. Aunque las concentraciones de metales en plasma sanguíneo podrían ser un indicio de exposición reciente, el Hg en el plasma podría indicar la presencia de una carga corporal persistente y por tanto, exposición crónica. Para discernir a qué tipo de exposición están sujetos los cocodrilos en el río Hondo, es necesario analizar tanto los biomarcadores de exposición y efecto del presente estudio, como su presencia en otras fracciones sanguíneas, en tejidos internos y en la orina.

Es probable que la contaminación en San Rafael de Pucté sea mayor que en los otros transectos debido a que existe una mayor cantidad de posibles fuentes; sin embargo, en el presente estudio se observó que en La Unión, el Hg se acumula en mayor medida en las crestas caudales, aunque existen menos fuentes potenciales de contaminación en dicho transecto. Un estudio de variaciones temporales y espaciales de metales xenobióticos, así como de fuentes de estos contaminantes, permitirían comprender por qué las concentraciones de Hg en dicho transecto son mayores.

Es interesante destacar que las MTs en el plasma sanguíneo podrían estar ligando metales como parte de sus funciones de regulación de metales fisiológicos y desintoxicación de metales xenobióticos. Sin embargo, las MTs no se encuentran en proporción directa con la concentración de metales pesados, como se había postulado.

No obstante, la tendencia observada con Cd indica que, en los cocodrilos, las MTs podrían estar relacionadas en mayor medida con este metal, aun cuando el análisis estadístico no reveló una correlación significativa. También es importante mencionar que las MTs no se expresan en las crestas de los cocodrilos, a pesar de que sí constituyen un sitio de acumulación de metales pesados.

Para determinar a qué metales se encuentran ligadas las MTs en el plasma, será preciso coleccionar un mayor número de muestras, homogeneizar el número de individuos coleccionados por clases de edad y determinar los complejos Cd-MT y Hg-MT, lo cual contribuiría a un mejor entendimiento de la síntesis de MTs y sus funciones en el cocodrilo de pantano. El presente estudio es un primer acercamiento que mide simultáneamente metales y MTs como biomarcadores de exposición y efecto, respectivamente, en cocodrilos en vida libre. Por consiguiente, sería pertinente implementar un programa de monitoreo a largo plazo en la cuenca del río Hondo para evaluar posibles variaciones temporales y la calidad del hábitat en la cuenca.

8. RECOMENDACIONES

Para la captura de los especímenes, se recomienda emplear el mismo número de individuos por clases de edad y sexo, así como un tamaño de muestra >20 individuos.

Para el análisis en plasma sanguíneo, si se utilizara el método de aspiración directa para la detección de Cu y Zn, se debe utilizar por lo menos 2 ml de plasma para obtener concentraciones por encima del límite de detección, o de ser posible, realizar el análisis con detectores de mayor sensibilidad.

Debido a la poca cantidad de crestas que se puede obtener de las crías y que no se debe extraer sangre de individuos <50 cm, no se recomienda realizar este tipo de análisis en esta clase de edad.

Para determinar si la exposición a metales en los organismos es reciente o crónica, es recomendable analizar tanto fracciones sanguíneas como la orina y heces, ya que la presencia de metales pesados en vías de desecho es reconocida como un indicador de exposición crónica.

Si bien el análisis de MTs totales funciona como un biomarcador de efecto, es recomendable el análisis de complejos metal-MT para esclarecer a qué metales y en qué proporción se encuentran ligadas a las MTs.

9. LITERATURA CITADA

- Almli B, M Mwase, T Sivertsen, MM Musonda y A Flåøyen. 2005. Hepatic and renal concentrations of 10 trace elements in crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Kafue and Luangwa rivers in Zambia. *Science of the Total Environment* 337: 75–82.
- Álvarez-Legorreta T. 2007. Monitoreo de la calidad del agua de la bahía de Chetumal y el río Hondo; Informe técnico final. CONACYT-COQCYT-Fondos Mixtos. México.
- Amiard JC, C Amiard-Triquet, S Barka, J Pellerin y PS Rainbowd. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160–202.
- Andreani G, M Santoro, S Cottignoli, M Fabbri, E Carpenè y G Isani. 2008. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of the Total Environment* 390: 287–294.
- Beck AB. 1956. The copper content of the liver and blood of some vertebrates. *Australian Journal of Zoology* 4(1): 1–18.
- Bell JU y JM Lopez. 1985. Isolation and partial characterization of a cadmium binding protein from the liver of alligators exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 82(1): 123–8.
- Bienengraber M, S Forderkunuz, D Klein y KH Summer. 1995. Determination of Cu-containing metallothionein: Comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Biochemistry* 228(1): 69–73.

- Brambila-Colombres EM y P Lozano-Zarain. 1999. Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. *Boletín de Educación Bioquímica* 18(1): 21–27.
- Buenfil-Rojas M y N Flores-Cuevas. 2007. Determinación de metales pesados (As, Cd, Hg y Pb) presentes en el Río Hondo, Quintana Roo. En: ANCA-UACH (coord.) *Memorias en extenso del VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales. VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales, 6, 7 y 8 de junio de 2007, Chihuahua, Universidad Autónoma de Chihuahua.* pp. 435–439.
- Burger J, M Gochfeld, AA Rooney, EF Orlando, AR Woodward y LJ Guillette. 2000. Metals and metalloids in tissues of American alligators in three Florida lakes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 501–508.
- Burger J, KR Campbell, TS Campbell, T Shukla, C Jeitner y M Gochfeld. 2005. Use of skin and blood as nonlethal indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49(2): 232–238.
- Campbell JW, MN Waters, A Tarter y J Jackson. 2010. Heavy metal and selenium concentrations in liver tissue from wild American alligator (*Alligator mississippiensis*) livers near Charleston, South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases* 46(4): 1234–1241.
- Casas-Andreu G, G Barrios-Quiroz y R Macip-Ríos. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(1): 261–273.

- Cedeño-Vázquez JR. 2002. Estado de conservación de *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* en el Río Hondo, Bahía de Chetumal y áreas anexas, Quintana Roo, México. Tesis de Maestría, El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Quintana Roo, México. 46 p.
- Cedeño-Vázquez JR, JP Ross, y S Calmé. 2006. Population status and distribution of *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in southeastern Quintana Roo, Mexico. *Herpetological Natural History* 10(1): 17–30.
- Cedeño-Vázquez JR, F González-Ávila y J Castro-Pérez. 2011. Condición corporal del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en el Río Hondo, Quintana Roo, México. *Quehacer Científico en Chiapas* 1(11): 19–26.
- Cedeño-Vázquez JR, SG Platt y J Thorbjarnarson (IUCN Crocodile Specialist Group). 2012. *Crocodylus moreletii*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. En: www.iucnredlist.org. Fecha de acceso: 7 de febrero de 2014.
- Chan HM, M Satoh, RK Zalups y MG Cherian. 1992. Exogenous metallothionein and renal toxicity of cadmium and mercury in rats. *Toxicology* 76(1): 15–26.
- Cisneros O, A Rivas, J Díaz y V Castanedo. 2011. Tratamiento de las aguas residuales del Ingenio Casasano en un humedal de flujo intermitente. IMTA-SEMARNAT, México.
- CITES. 2013. Apéndices I, II y III. <http://www.cites.org/esp/app/appendices.php>
- Cook RA, J Behler y P Brazaitis. 1989. Elevated heavy metal concentrations in captive crocodilians—2 cases. En: Conference Proceedings, American Association of Zoo Veterinarians, Media, Pennsylvania, October 1989. 151 p.

- Cupul-Magaña F, A Rubio-Delgado, C Reyes-Núñez, E Torres-Campos y L Solís-Pecero. 2010. Ataques de cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) en Puerto Vallarta, Jalisco, México: presentación de cinco casos. Cuaderno Médico Forense 16(3): 153–160.
- Deb SC y T Fukushima. 1999. Metals in aquatic ecosystems: Mechanisms of uptake, accumulation and release-ecotoxicological. International Journal of Environmental Studies 56: 385–417.
- Defew LH, JM Mair y HM Guzman. 2005. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. Marine Pollution Bulletin 50(5): 547–552.
- Delany MF, JU Bell y SF Sundlof. 1988. Concentrations of contaminants in muscle of the American alligator in Florida. Journal of Wildlife Diseases 24(1): 62–66.
- Dobrovoljc K, I Falnoga, B Bulog, M Tušek-Žnidarič y J Ščančar. 2003. Hepatic metallothioneins in two neotenic salamanders, *Proteus anguinus* and *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 135(3): 285–294.
- Dobrovoljc K, I Falnoga, MT Žnidarič, D Mazej, J Ščančar y B Bulog. 2012. Cd, Cu, Zn, Se, and metallothioneins in two amphibians, *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). Biological Trace Element Research 150(1–3): 178–94.

- Domínguez-Laso J, O Hinojosa-Falcón y S Padilla-Paz. 2011. Método de marcaje y recaptura de ejemplares (MRE). En: O Sánchez-Herrera, G López-Segurajáuregui, A García-Naranjo-Ortiz-de-la-Huerta y H Benítez-Díaz (comp). Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Eisler R. 1998. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review (No. USGS/BRD/BSR--1997-0002). Geological Survey Washington DC.
- Euán-Ávila JI, MA Liceaga-Correa y H Rodríguez-Sánchez. 2002. Caracterización de fuentes no puntuales de contaminación agrícola en el municipio de Othón P. Blanco en Quintana Roo y su potencial influencia en la Bahía de Chetumal. En: FJ Rosado-May, R Romero-Mayo y A De-Jesús-Navarrete. Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia. UQROO, Chetumal, Quintana Roo, México. pp. 197–204.
- Fingerman M, M Devi, PS Reddy y R Katyayani. 1996. Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. *Zoological Studies* 35(1): 1–8.
- Flos R, J Bas y J Hidalgo. 1986. Metallothionein in the liver of the small lizard (*Podarcis muralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 83: 93–98.
- Fossi MC y L Marsili. 1997. The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals. *Biomarkers* 2: 205–216.

- García-Grajales J y MA López-Luna. 2010. Información de soporte en línea - Análisis bibliográfico del conocimiento de los cocodrilianos en México. *Revista Latinoamericana de Conservación* 1(2): 25–31(1–16).
- García-Ríos V y G Gold-Bouchot. 2003. Trace metals in sediments from Bahía de Chetumal, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70(6): 1228–1234.
- Gil-Hernández F. 2000. El papel de los biomarcadores en la toxicología humana. *Revista de Toxicología* 17(1): 19–26.
- Guirlet E, K Das y M Girondot. 2008. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology* 88: 267–276.
- Heaton-Jones TG, BL Homer, DL Heaton-Jones y SF Sundlof. 1997. Mercury distribution in American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28(1): 62–70.
- Hidalgo J, R Chung, M Penkowa y M Vašák. 2009. Structure and function of vertebrate metallothioneins. En: *Metal ions in life sciences*, Vol. 5. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp. 279–317.
- Ikonomopoulou MP, H Olszowy, C Limpus, R Francis y J Whittier. 2011. Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. *Marine Environmental Research* 71: 10–16.
- Innis C, M Tlusty, C Perkins, S Holladay, C Merigo y S Weber III. 2008. Trace metal and organochlorine pesticide concentrations in cold-stunned juvenile Kemp's Ridley Turtles (*Lepidochelys kempii*) from Cape Cod, Massachusetts. *Chelonian Conservation and Biology* 7(2): 230–239.

- Jagoe CH, B Arnold-Hill, GM Yanocho, PV Winger y IL Brisbin Jr. 1998. Mercury in alligators (*Alligator mississippiensis*) in the southeastern United States. *Science of the Total Environment* 213(1): 255–262.
- Jeffree RA, SJ Markich y JR Twining. 2001. Element concentrations in the flesh and osteoderms of estuarine crocodiles (*Crocodylus porosus*) from the Alligator Rivers region, northern Australia: biotic and geographic effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 236–245.
- Kolf-Clauw M, A Guénin y MP López. 2007. Micromamíferos y metales pesados: biomonitorización del medio ambiente. *Observatorio Medioambiental* 10: 19–37.
- Lance VA, T Cort, J Masuoka, R Lawson y P Saltman. 1995. Unusually high zinc concentrations in snake plasma, with observations on plasma zinc concentrations in lizards, turtles and alligators. *Journal of Zoology* 235(4): 577–585.
- Lehner AF, W Rumbelha, A Shlosberg, K Stuart, M Johnson, R Domenech y H Langner. 2013. Diagnostic analysis of veterinary dried blood spots for toxic heavy metals exposure. *Journal of Analytical Toxicology* 37(7): 406–422.
- López-Artíguez M y M Repetto. 1995. Estado actual de la toxicología del cadmio. En: M Repetto (ed). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, Madrid. pp. 393–423.
- Magnon-Basnier C. 2002. El río Hondo como componente hidrológico de la Bahía de Chetumal y como corredor biológico compartido amenazado. En: FJ Rosado-May, R Romero-Mayo y A De-Jesús-Navarrete. *Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia*. UQROO, Chetumal, Quintana Roo, Mexico, pp. 23–32.
- Margoshes M y BL Vallee. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79: 4813–4814.

- Messel H, GC Vorlicek, AC Wells y WJ Green. 1981. Surveys of tidal rivers systems in the Northern Territory of Australia and their crocodile populations. Monographs 15–17, Pergamon Press Sydney.
- NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Nomiyama K, H Nomiyama y N Kameda. 1998. Plasma cadmium–metallothionein, a biological exposure index for cadmium-induced renal dysfunction, based on the mechanism of its action. *Toxicology* 129(2): 157–168.
- Nordberg M y G Nordberg. 2009. Metallothioneins: Historical Development and Overview. En: *Metal Ions in Life Sciences*, Vol. 5. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp. 1–29.
- Ortiz-Cervantes A y R Rubio-Lozano. 2012. Reptiles. Características generales, biología y diversidad de especies. En: *Curso de cría, mantenimiento y patología de animales exóticos*. Universidad de Murcia, España. pp. 27 – 30.
- Perry EF, SR Koirtzohann y HM Perry Jr. 1975. Determination of cadmium in blood and urine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. *Clinical Chemistry* 21(4): 626–629.
- Peters LJ. 1983. Mercury accumulation in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Tesis de Maestría. University of Florida.
- Platt S, T Rainwater, A Finger, JB Thorbjarnarson, T Anderson y S McMurry. 2006. Food habits, ontogenetic dietary partitioning and observations of foraging behaviour of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Northern Belize. *Herpetological Journal* 16: 281–290.

- Rainwater TR, BM Adair, SG Platt, TA Anderson, GP Cobb y ST McMurry. 2002. Mercury in morelet's crocodile eggs from Northern Belize. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 324(1): 319–324.
- Rainwater TR, TH Wu, AG Finger, JE Cañas, L Yu, KD Reynolds, G Coimbatore, B Barr, SG Platt, GP Cobb, TA Anderson y ST McMurry. 2007. Metals and organochlorine pesticides in caudal scutes of crocodiles from Belize and Costa Rica. Science of The Total Environment 373(1): 146–156.
- Rodríguez E, J Monserrat, D Medesani, R Bigi, P Rodríguez-Moreno, L López-Greco, V Stella, C Cervino y M Ausaldo. 1998. Efectos letales y subletales de plaguicidas y metales pesados en cangrejos de estuario. Revisión de una década de investigaciones. Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales 150: 1–17.
- Sánchez-Herrera O, G López-Segurajáuregui, A García-Naranjo-Ortiz de la Huerta y H Benítez-Díaz. 2011. Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 270 p.
- Sánchez-Rodríguez LH. 2009. Comparación de dos métodos de determinación de mercurio total en cabello por espectroscopías de absorción atómica con generador de hidruros y diferencial de efecto zeeman con pirolizador. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia.
- Santucci B, A Amantea, MC Giuliano, C Valenzano y A Cristaudo. 2000. Expression of metallothioneins-I and -II isoforms at positive patch-test sites. Contact Dermatitis 43: 103–106.

- Scheuhammer AM y MG Cherian. 1991. Quantification of metallothionein by silver saturation. *Methods in Enzymology* 205: 78–83.
- Schneider L, R Pacheco-Peleja, A Kluczkovski Jr., G Martinez-Freire, B Marioni, RC Vogt, R Da-Silveira. 2012. Mercury concentration in the spectacled caiman and black caiman (*Alligatoridae*) of the amazon: Implications for human health. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 270–279.
- Schneider L, W Maher, A Green y RC Vogt. 2013. Mercury contamination in reptiles: An emerging problem with consequences for wild life and human health. En: KH Kim y RJC Brown (edits). *Mercury: Sources, applications and health impacts*. Nova Science Publishers, Inc. *Chemistry Research and Applications* pp. 173–232.
- Scott-López EH. 2007. Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. *Revista de Educación Bioquímica*. UNAM, Distrito Federal 26(2): 67–72.
- Secretaría de Relaciones Exteriores-Comisión Internacional de Límites y Aguas (SRE-CILA México-Belice). 1998. “Acta 1” en *Sección Mexicana de la Comisión Internacional de Límites y Aguas entre México y Belice*. [En línea], México. Disponible en: <http://portal.sre.gob.mx/cilasur/index.php?option=displaypage&Itemid=64&op=page&SubMenu=> [Accesado el día 6 de agosto de 2012].
- Shaikh ZA y K Hirayama. 1979. Metallothionein in the extracellular fluids as an index of cadmium toxicity. *Environmental Health Perspectives* 28: 267–71.
- Shaikh ZA y LM Smith. 1984. Biological indicators of cadmium exposure and toxicity. *Experientia* 40(1): 36–43.

- Sigler L, JR Cedeño-Vázquez, FG Cupul-Magaña. 2011. Método de detección visual nocturna (DVN). En: O Sánchez-Herrera, G López-Segurajáuregui, A García-Naranjo-Ortiz-de-la-Huerta, H Benítez-Díaz (comps). *Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (Crocodylus moreletii) México-Belice-Guatemala*. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Silbergeld EK y DL Davis. 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clinical Chemistry* 40: 1363–1367.
- Simoniello P, S Filosa, M Riggio, R Scudiero, S Tammara, F Trinchella y CM Motta. 2010. Responses to cadmium intoxication in the liver of the wall lizard *Podarcis sicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151(2): 194–203.
- Smith PN, GP Cobb, C Godard-Codding, D Hoff, ST McMurry, TR Rainwater y KD Reynolds. 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150: 41–64.
- Suzuki KT, H Akitomi y R Kawamura. 1984. Cadmium, copper and zinc-binding protein (metallothionein) in the liver of the water lizard *Triturus pyrrhogaster*. *Toxicology Letters* 21: 179–184.
- Trillanes-Flores CE. 2013. Análisis de minerales no esenciales en escamas de *Crocodylus moreletii* en Campeche México. Tesis de Maestría, El Colegio de la Frontera Sur, Lerma, Campeche. 95 p.
- Triunfante P, ME Soares, A Santos, S Tavares, H Carmo y ML Bastos. 2009. Mercury fatal intoxication: Two case reports. *Forensic Science International* 184: e1–e6.
- Van-deer-Oord JJ y M De-Ley. 1994. Distribution of metallothionein in normal and pathological human skin. *Archives of Dermatological Research* 286: 62–68.

- Walker CH, SP Hopkin, RM Sibly y DB Peakall. 1996. Biomarkers. En: Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London. pp.175–194.
- Woodward AR y WR Marion. 1978. An evaluation of factors affecting night-light counts of alligators. Proceedings of the annual conference southeastern association fish and wildlife agencies. 32: 291–302.
- Xu Q, S Fang, Z Wang, Z Wang. 2006. Heavy metal distribution in tissues and eggs of Chinese alligator (*Alligator sinensis*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50: 580–586.
- Yamamura M y KT Suzuki. 1984. Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise *Clemmys mutica*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 79: 63–69.

10. ANEXOS

10.1 Artículo enviado a Archives of Environmental Contamination and Toxicology

1 **Presence of Heavy Metals and Metallothioneins in Morelet's crocodile (*Crocodylus*** 2 ***moreletii*), From a Transboundary River between Mexico and Belize**

3 A. M. Buenfil-Rojas¹, T. Alvarez-Legorreta¹, J. R. Cedeño-Vazquez^{2*}

5 ¹ Environmental Biotechnology. Department of Sustainability Sciences. El Colegio de la Frontera Sur. Av.
6 Centenario Km 5.5, 77014 Chetumal, Quintana Roo, Mexico.

7 ² Systematic, Ecology and Management of Aquatic Resources. Department of Aquatic Systematic and Ecology. El
8 Colegio de la Frontera Sur. Av. Centenario Km 5.5, 77014 Chetumal, Quintana Roo, Mexico.

9 *E-mail: rcedenov@ecosur.mx, rogeliocedeno@gmail.com

10
11 **Abstract** The aim of this study was to determine concentrations of heavy metals (cadmium [Cd] and mercury [Hg])
12 and metallothioneins (MTs) in blood plasma and caudal scutes of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from
13 Rio Hondo, a river and natural border between Mexico and Belize. For this purpose three transects of the river (ca.
14 20 km each) were surveyed in September 2012 and April 2013, and samples were collected from 24 crocodiles were
15 collected from these areas. In blood plasma, Cd (7.6 ± 9.6 ng/ml) was detected in 69% of samples (n=9), Hg ($12.2 \pm$
16 9.2 ng/ml) was detected in 46% of samples (n=6), and MTs (10900 ± 9400 ng/ml) were detected in 92% of samples
17 (n=12). In caudal scutes samples, Cd (31.7 ± 39.4 ng/g) was detected in 84% of samples (n=12) and Hg ($374.1 \pm$
18 429.4 ng/g) in 83% of samples (n = 20). No MTs were detected in caudal scutes. Hg concentrations in scutes from
19 the Rio Hondo were 2 to 5-fold greater than those previously reported in scutes from other localities in northern
20 Belize. In blood plasma, a significant positive relationship between Hg and body size was observed. Mean
21 concentrations of Cd and MTs in size classes suggest MTs may be related to Cd exposure. This is the first report of
22 MTs present in crocodile blood.

23

24 Heavy metal pollution in terrestrial and aquatic ecosystems has increased in the last 50 years (Schneider et al. 2013).
25 Because of the persistence of metals in the environment, there is a concern about the impact of agricultural activities
26 and untreated sewage on ecosystems (Defew et al. 2005; Schneider et al. 2013). Heavy metals are non-biodegradable
27 and can be toxic to both vertebrate and invertebrate fauna. Once absorbed by an organism, metals can biomagnify
28 through the food chain (Heaton-Jones et al. 1997) and affect regulatory and metabolic processes in exposed
29 organisms such as cellular respiration, metabolism of lipids and carbohydrates, hormonal secretion and synthesis, as
30 well as reproduction and growth (Fingerman et al. 1996). Depending on the exposure concentration, metal toxicity
31 can also result in mortality (Vazquez 2005).

32
33 Although environmental pollution has been recognized as one of the major threats to reptiles, research regarding the
34 impacts of heavy metals on reptile populations is limited (Smith et al. 2007). The primary routes of heavy metal
35 exposure in crocodylians are ingestion, dermal contact, maternal transfer and potentially egg contact with metals in
36 nesting media (Smith et al. 2007). Several studies have reported heavy metals in various crocodylian tissues (Delany
37 et al. 1988; Burger et al. 2000; Almlı et al. 2005; Campbell et al. 2010). In Morelet's crocodile (*Crocodylus*
38 *moreletii*), Rainwater et al. (2002, 2007) determined mercury (Hg), cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb), and zinc
39 (Zn) concentrations from animals sampled in northern Belize.

40
41 Metallothioneins (MTs) are heavy metal binding proteins that play an important role in the transport of metals in
42 internal tissues and have been related to heavy metal detoxification in mammals (Margoshes and Valle 1957,
43 Nordberg and Nordberg 2009). Studies with laboratory mice suggest that even after a single exposure to cadmium,
44 significant proportions of the cadmium-metallothionein (Cd-MT) complex may be found in plasma (Nordberg and
45 Nordberg 2009). Some studies have noted that Cd and Hg induce expression of MTs in reptiles, just as in mammals
46 and birds (Hidalgo et al. 2009). However, there is a significant lack of information regarding MTs in reptiles,
47 although they have been identified in Asian tortoises (*Clemmys mutica*) (Yamamura and Suzuki 1984) and American
48 alligators (*Alligator mississippiensis*) (Bell and Lopez 1985).

49
50 In humans, the MT isoform MT-IV is expressed in the stratified squamous epithelium of the skin, tongue and upper
51 alimentary tract (Santucci et al. 2000). In addition, expression of the MT-I and MT-II isoforms have been observed

52 in basal keratinocytes of the epidermis (Van-deer-Oord and De-Ley 1994). Reptiles are characterized by a hard, dry
53 skin which consists of a thin epidermis and a thicker dermis (Ortiz-Cervantes and Rubio-Lozano 2012); their scales
54 are mainly epidermal and formed by keratin. In crocodylians, scutes can remain throughout life and grow gradually
55 (Ortiz-Cervantes and Rubio-Lozano 2012). Therefore, although not previously reported, it is possible that MTs may
56 also be found in caudal scutes of crocodiles.

57
58 Studies in the Rio Hondo, a transboundary river between southern Mexico and northern Belize, and Chetumal Bay,
59 in which the Rio Hondo drains, have reported heavy metals in water and sediments and suggest that pollution sources
60 are human settlements and the use of agrochemicals in the Rio Hondo basin (Euan-Avila et al. 2002; García-Ríos and
61 Gold-Bouchot 2003; Buenfil-Rojas and Flores-Cuevas 2007). Morelet's crocodile inhabits the Rio Hondo and
62 associated wetlands (Cedeño-Vazquez et al. 2006), but the accumulation and impact of heavy metals in this
63 population remains uncertain. The aim of the present study was to determine the presence of Cd and Hg in blood
64 plasma and caudal scutes of Morelet's crocodiles from Rio Hondo, and MTs as a heavy metal detoxification
65 mechanism.

66 67 **Material and Methods**

68 Study Area

69 The Rio Hondo is located in the south-east of the Yucatan Peninsula, and is considered the natural border between
70 Mexico and Belize (Figure 1) (Magnon-Basnier 2002). It extends approximately 115 km from La Unión village to
71 Chetumal Bay (CONAGUA 2012). Morelet's crocodiles were sampled along three transects of the Rio Hondo (ca.
72 20 km each), named according to a representative human settlement as: 1) Pucte (18°11' N, 88°41' W – 18°18' N,
73 88°35' W), 2) Cocoyol (18°02' N, 88°45' W – 18°10' N, 88°40' W), and 3) La Unión (17°54' N, 88°53' W – 18°01'
74 N, 88°46' W) (Figure 1). These transects were selected considering potential sources of heavy metal pollution from
75 agricultural areas, and discharges of wastewater (Euan-Avila et al. 2002).

76 77 Sample Collection

78 Caudal scutes and blood plasma samples were collected from crocodiles in September 2012 and April 2013.
79 Crocodiles were captured by traditional active methods using snares (Messel et al. 1981; Woodward and Marion

80 1978). Total length (TL), body mass, and sex were determined for each animal. Size classes were based on TL as:
81 yearlings (≤ 50 cm), juveniles (51 – 100 cm), subadults (101 – 150 cm), and adults (>150 cm) (Sigler et al. 2011).

82 Blood was obtained from the dorsal postcranial sinus, stored in tubes containing lithium heparin, mixed by inversion
83 (Sanchez-Herrera et al. 2011) and stored on ice in the field. Plasma was obtained by centrifugation at 3157 RPM for
84 15 min in a portable centrifuge (Mobilespin, Yulcon Technology).

85 Caudal scutes were removed with a scalpel and placed in labeled plastic containers (previously treated with 5%
86 HNO_3). Iodine solution was applied to scute removal sites to prevent potential infection. Plasma and scutes samples
87 were stored on ice until the arrival to the laboratory, where they were stored frozen until analysis (Rainwater et al.
88 2007).

89

90 Metals Analysis

91 Prior to use, all glassware was washed with phosphate-free detergent (1:1), rinsed with tap water and then kept in
92 acid solution for 24 hours (5% HNO_3 for Cd and HCl 1N for Hg and MTs). Glassware was subsequently rinsed with
93 distilled water (Andreani et al. 2008; Perry et al. 1975). Analysis of Cd and Hg was adapted from several methods
94 (Andreani et al. 2008; Delany et al. 1988; Perry et al. 1975; Rainwater et al. 2007). Samples were thawed at room
95 temperature and then 0.5 – 1 ml of plasma and 0.2 – 0.5 g of scutes were transferred to 100 ml Teflon beakers.
96 Before analysis, scutes were rinsed with deionized water to remove any possible external contamination.

97 Acid digestion was performed by adding 2 ml of concentrated HNO_3 to each beaker and allowing samples to
98 predigest for 2 days. Samples were then heated for 4 hours at 90 °C and cooled for 30 minutes. They were then
99 treated with 30% H_2O_2 and reheated for 2 hours. Samples were cooled and filtered with no. 2 Whatman filter paper
100 in 10 ml volumetric flasks and brought to volume with 1% HNO_3 for Cd analysis. Filtered samples for Hg were
101 placed in 25 ml volumetric flasks and treated with 1.25 ml of KMnO_4 until persistence of a purple color (Sánchez-
102 Rodríguez 2009; Triunfante et al. 2009). Solutions were clarified with 12% $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ and brought to volume with
103 deionized water.

104 Samples were analyzed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) (Avanta PM-
105 GF3000, GBC) for Cd and Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry (HGAAS) (Avanta PM-HG
106 3000, GBC) for Hg. Accuracy of the analysis was determined using certified reference material TORT-2 (lobster

107 hepatopancreas) from National Research Council of Canada (NRC-CNRC), and sample blanks. The detection limits
108 were 3.9 ng Cd/g and 2.3 ng Hg/g, and recovery percentages were 92.1% ± 3 to Cd and 94.3% ± 9.5 to Hg.

109
110 **Metallothioneins Analysis**
111 To obtain the cytosol from scutes, 0.2 - 0.5 g of frozen tissue were placed into a 5 ml tube with 4 vol of sucrose
112 solution (0.25 M). Samples were homogenized at high-speed with a Tissue Tearor (Model 985370-395, Biospec
113 Products Inc.) for 5 minutes (due to the hardness of the tissue). Resulting homogenate was centrifuged at 18000 g for
114 20 minutes at 4 °C (Scheuhammer and Cherian 1991). The supernatant fluid was transferred to an Eppendorf tube
115 and frozen until analysis. Plasma aliquots were analyzed directly.

116 Scute cytosol and 0.1 to 0.5 ml of plasma were placed in Eppendorf tubes. The MT assay was performed following
117 the silver saturation method (Scheuhammer and Cherian 1991; Bienengraber et al. 1995). The final supernatants
118 were aspirated, transferred to 5 ml volumetric flasks and brought to volume with 1% HNO₃. Silver (Ag) was
119 measured by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS) (Avanta PM, GBC); for the stoichiometry, it
120 was assumed 1 µg of Ag⁺ represented 3.55 µg of MTs. Accuracy of the analysis was determined using the reference
121 standard Metallothionein COP03 95% (metallothionein from rabbit liver) from Creative Biomart (NY, USA) and
122 sample blanks. The detection limits were 0.7 µg Ag/ml and recovery percentage for MTs was 89.2% ± 1.9.

123
124 **Statistical Analyses**
125 Statistical analyses were performed using the statistical software Statistica (Version 7.0, Statsoft). Due to a small
126 sample size (n<30) and failure to achieve normality and homogeneity of variance, nonparametric procedures were
127 used. A Mann-Whitney test was performed to detect differences in metals and MTs concentrations between sexes.
128 Additionally, a Kruskal-Wallis test was used to identify differences in metals and MTs concentrations between the
129 three sampled transects, and between size classes. Spearman correlations were performed to detect relationships
130 between concentrations of metals and MTs. Finally linear regression analyses were performed to detect relationships
131 between metals and MTs concentrations and TL, SVL and body mass. For statistical purposes, concentrations falling
132 below detection limits were assigned values of one-half the detection limit for that particular analyte (Rainwater et
133 al. 2007). All tests were considered significant when p≤0.05.

134

135 **Results**

136 A total of 24 Morelet's crocodiles was captured along the surveyed transects, ranging from 32 to 190.5 cm TL (Table
137 1). Caudal scutes were collected from all crocodiles, while blood plasma samples were obtained only from 13
138 individuals (64-190 cm TL).

139
140 **Heavy Metals**
141 In blood plasma, Cd was detected in 100% of samples from Pucte (n=5) and Cocoyol (n=2), and 33% from La Unión
142 (n=2); whereas Hg was only detected in 40% of samples from Pucte (n=2), and 67% in samples from La Union (n=4)
143 (Table 2). No significant differences existed in Cd and Hg concentrations between sexes. Significant differences
144 were observed in Cd concentrations between crocodiles from Pucte and the other transects (p=0.047); as well as Hg
145 concentrations between adults and the other size classes (p=0.04). A significant positive relationship (p<0.05) was
146 observed between concentrations of Hg and TL, SVL, and body mass.

147
148 In caudal scutes Hg was detected in 100% of samples from La Union (n=8), in 71% (n=5) from Cocoyol, and in 78%
149 (n=7) from Pucte. Due to the small amount of tissue obtained from caudal scutes of small crocodiles, it was possible
150 to analyze Cd from only 13 individuals (Pucte [4], Cocoyol [4], and La Unión [5]). This metal was detected in 100%
151 of crocodiles from Pucte and La Union, and in 50% from Cocoyol (Table 2). Significant differences were observed
152 in Cd concentration in subadult males, with greater values when compared to subadult females (p=0.05). No
153 significant differences were detected in the relationships between Hg or Cd concentrations and sampled transects,
154 sexes, TL or body mass of crocodiles.

155 Mean concentrations of Cd in adults (16.04 ± 1.45 ng/g, w.w.) were considerably lower compared to the other size
156 classes, whereas concentrations of Hg in juveniles (630.4 ± 806.8 ng/g, w.w.) were the highest. Scute samples from
157 hatchlings contained detectable amounts of Hg (271.3 ± 162.1 ng/g, w.w.), with a maximum concentration of 435
158 ng/g.

159
160 **Metallothioneins**
161 In blood plasma, MTs were detected in 100% of samples from Pucté (n=5) and La Union (n=6), while values
162 occurred only in one sample (50%) from Cocoyol. No MTs were detected in caudal scutes (Table 2). No significant

163 relationships between MTs concentrations and TL, SVL, and body mass were observed. Also, no significant
164 differences were detected in MTs concentrations between sexes, and transects. The disparities in sample size of
165 juveniles, subadults and adults (4:7:2) precluded some statistical analyses. Nevertheless, mean concentrations of Cd
166 and MTs in the three size classes were closely related, but not significant (Fig. 2).
167 Finally, Spearman correlation test revealed no relationships between metals (Cd and Hg) and MTs concentrations.

168

169 **Discussion**

170 Heavy Metals in Blood Plasma

171 Because there have been no studies of heavy metal concentrations in blood plasma of crocodiles, the results for
172 Morelet's crocodile in this study can only be compared with similar studies of other reptile groups. The presence of
173 Cd and Hg in blood plasma may be due to recent exposure (Shaikh & Smith 1984). However, studies in water snakes
174 (*Nerodia sipedon*) suggest Hg in blood of these organisms is directly proportional to the accumulation in internal
175 tissues (liver, kidney and muscle) (Burger et al. 2005). Therefore, Hg present in plasma could be an indicator of
176 chronic exposure.

177 Some studies have noted Hg in blood is directly related to the body burden of Hg in organisms; i.e., the total amount
178 before excretion. When exposure is recurrent, this becomes a persistent body burden (Burger et al. 2005). Hg
179 detected in plasma of Morelet's crocodiles in this study, is directly proportional to the TL, the SVL and body mass of
180 individuals. This suggests that body burdens of Hg increase with increasing body size (Andreani et al. 2008), a
181 pattern also observed in wild cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*) using liver, kidney, and tail tips (Rainwater et
182 al. 2005). It is noteworthy the concentrations of Hg obtained in this study (4-29 ppb) are within the values reported
183 for other wildlife species (<50 ppb), including birds, mammals and reptiles (Lehner et al. 2013). If Hg concentrations
184 in plasma and internal tissues are directly proportional (Burger et al. 2005), is likely Hg in plasma represents a
185 persistent body burden and not a recent exposure. To corroborate this theory, it would be pertinent to analyze
186 relationships between plasma and internal tissues.

187 The highest values of Hg in blood plasma of adults (according to significant differences between size classes)
188 confirm that there is a correlation between this metal and crocodiles size. Although values are within those reported
189 in reptiles (Lehner et al. 2013), biological and genetic effects of chronic exposure to Hg in crocodiles remain
190 unknown (Schneider et al. 2012). Even if Hg in plasma represented the total body burden, it must be noted that

191 crocodilians appear to possess a remarkable capacity to accumulate Hg without presenting toxic effects; e.g.,
192 emaciation, malformations or abnormal motor coordination (Peters 1983; Rainwater et al. 2002). However, Hg was
193 only analyzed in two adults; therefore, a larger sample size and a similar number of individuals by size classes are
194 required to confirm these correlations. Brisbin et al. (1998) reported elevated Hg concentrations (ppm wet mass:
195 muscle 3.48, kidney 33.55, liver 158.85) in a large adult *Alligator mississippiensis* found dead in a mercury-
196 contaminated pond in South Carolina, USA. Because these concentrations exceeded mercury levels shown to be
197 lethal in various birds, mammals, and amphibians under laboratory conditions (Wolfe et al. 1998), and due to the
198 animal's emaciated condition at the time of death, Brisbin et al. (1998) suggested this may be the first documented
199 case of mercury-related mortality in a crocodilian.

200

201 Heavy metals in caudal scutes

202 The results obtained for caudal scutes indicate that Morelet's crocodiles in the Rio Hondo have been exposed to Cd
203 and Hg, these metals are accumulated in their tissues. Some studies in *Alligator mississippiensis* (Heaton-Jones et al.
204 1997; Jagoe et al. 1998; Burger et al. 2000), and water snakes (*Nerodia sipedon*) (Burger et al. 2005) also reported
205 accumulation of heavy metals in internal and external tissues (scutes). Burger et al. (2000) mentioned the strong
206 correlation between scutes and internal tissues in *A. mississippiensis*, and suggested that high concentrations of Cd
207 and Hg may represent internal accumulation.

208 Overall, Cd and Hg concentrations detected in scutes obtained in this study were higher than those reported for
209 Morelet's crocodiles in northern Belize (Table 3), suggesting that exposure to these metals is greater in the Rio
210 Hondo basin. Although difference in Hg between transects was not significant, it was noted that concentrations from
211 La Union (561.63 ± 224.73 ng/g) were higher than those at the other transects, as well as two sites previously
212 sampled in northern Belize (98.7 ± 21.6 ng/g) (Rainwater et al. 2007). A possible explanation could be presence of
213 the Booth's river in Belize, which drains into the Río Hondo (very close from La Unión). This river may receive Hg
214 coming from an area with intense use of agrochemicals by Mennonites from Blue Creek village (Magnon-Basnier,
215 2002).

216

217 Although crocodilians may absorb large amounts of heavy metals, they also exhibit several detoxification
218 mechanisms. This was evidenced by studies in *Alligator sinensis* of the Zhejiang Province in China, where

219 individuals accumulated greater proportions of Hg in liver and kidneys, while Cd was mostly eliminated through
220 feces (Xu et al. 2006). It is possible that *C. moreletii* excretes excess Cd, but Hg is more likely to accumulate in
221 internal tissues, which is consistent with results of Hg in blood plasma in this study.

222 Some studies suggest Cd concentrations must exceed 200 ppm in the kidneys to produce nephrotoxic effects (for
223 example, Shaikh and Hirayama 1979). Cd concentrations obtained from caudal scutes of *C. moreletii* from Rio
224 Hondo do not exceed 145 ppb. Assuming that Cd in scutes is directly proportional to Cd in liver and kidneys (Burger
225 et al. 2000), crocodiles sampled in the present study may not be at risk of hepatic or renal toxicity.

226 Metal accumulation varies among aquatic and terrestrial species depending on a variety of factors (Smith et al.
227 2007), thus the finding that the highest Cd and Hg concentrations observed in this study were in juveniles, may be in
228 part due to the diet, which is based mostly on aquatic gastropods, crustaceans, fish and non-fish vertebrates (Platt et
229 al. 2006). In fact, gastropods usually inhabit substrates rich in organic matter where contaminants are accumulated in
230 higher concentrations (Bryan and Langston 1992).

231 Differences between Cd concentrations in the scutes of subadult males and females, suggest that males accumulate
232 larger amounts of this metal than females. Nordberg and Nordberg (2009) mentioned when an organism presents
233 deficiencies of essential metals, particularly iron (Fe), it tends to absorb larger amounts of toxic metals, such as Cd.
234 As for the females, it is possible that at this stage of their lives, when they are reaching their sexual maturity (Casas-
235 Andreu et al. 2011), they absorb larger amounts of essential metals due to the reproductive cycles, thus, Cd absorption
236 remains low (Lance et al. 1995; Nordberg and Nordberg 2009). However, a similar sample size between size classes
237 would be necessary to establish a better conclusion, since the small size of adults (n=2; 1F:1M sex ratio) precluded
238 the statistical analyses.

239

240 Metallothioneins

241 Our results indicate that MTs are present in blood plasma, but not in the caudal scutes of Morelet's crocodiles, and
242 that MTs concentrations are higher than concentrations of metals. MTs in blood plasma may appear long before the
243 effects of nephrotoxicity are manifested (Shaikh and Hirayama 1979). Once toxic metals are found in the tissues of
244 the organisms, MTs bind these metals to prevent any toxic effect (Amiard et al. 2006). High concentrations of metal-
245 MT complexes in internal organs tend to retard the transfer of metals into the blood; therefore, MTs concentration in
246 plasma is greater (Deb and Fukushima 1999). It should also be considered MTs bind multiple metal ions, thus they

247 could not only regulate Cd and Hg toxicity, but also essential metals in order to perform metabolic processes in the
248 organism (Amiard et al. 2006). Similarly, metals in blood plasma not only bind to MTs, but also to other proteins
249 such as albumin and globulins (Shaikh and Hirayama 1979).

250 MTs in our study were not correlated with the concentrations of heavy metals, TL, SVL nor weight. Also, no
251 significant differences in MTs concentrations between size classes, sexes or transects were observed. Nordberg and
252 Nordberg (2009) described the main function of MTs in blood plasma consists in transporting metal-MT complexes
253 to other organs. Therefore, MTs synthesis does not occur in blood plasma, but in response to the presence of Cd in
254 the liver. Depending on the type of exposure, the release of MTs in the bloodstream may be fast (recent exposure) or
255 slow (chronic exposure). If a chronic exposure exists, MTs synthesis becomes continuous. Although significant
256 differences in transects were not observed, the highest concentrations of metals and MTs were detected in samples
257 from Pucté. These findings suggest concentrations of MTs in crocodiles may not depend on their age or size, but the
258 type of exposure. Even if no significant differences in sexes were observed, the highest concentrations of MTs were
259 observed in males. Previously, it was noted male organisms tend to hold higher amounts of MTs than females,
260 though this trend has not been clearly described (Nordberg and Nordberg 2009).

261 The trend observed in Cd and MTs may be due to this protein induction and the formation of Cd-MT complexes,
262 while in Hg, no trend related to MTs was noted. Chan et al. (1992) conducted a controlled assay (seven days) in
263 which they injected Cd, Hg, Cd-MT and Hg-MT in rats, and observed that both Hg as Hg-MT induce synthesis of
264 MTs only in kidneys, unlike Cd and Cd-MT, which induce the synthesis in both, liver (Cd) and kidneys (Cd-MT). In
265 addition, MTs levels in blood plasma increased after three days of injecting Cd, which did not occur with injections
266 of Hg. These findings suggest hepatic MT significantly influences MTs in blood plasma, and Cd is the metal
267 inducing the synthesis of MTs in the liver. Since Hg does not induce MTs in the liver, presence of Hg or Hg-MT in
268 plasma is not significant (Chan et al. 1992).

269 Although some studies demonstrate the presence of MTs in skin (Santucci et al. 2000), in this study no MTs in scutes
270 of Morelet's crocodile were detected. This may be an artifact of improper extraction of scute cytosol, due to their
271 hardness. Nevertheless, MTs may not express in crocodile's skin. Dobrovoljc et al. (2012) examined MT in different
272 organs of salamanders (*Necturus maculosus*) and toads (*Bufo bufo*). Interestingly, both species presented
273 concentrations of MTs and Cd-MT in liver and kidneys, but in the skin although MTs were not expressed, Cd

274 concentrations were detected. This proves that heavy metals are stored in caudal scutes, but MTs are not synthesized
275 and thus, metal-MT complexes are not formed.

276

277 **Conclusions**

278 The present study demonstrated that Morelet's crocodile is exposed to heavy metal pollution in the study area, and its
279 capacity like other crocodylians to accumulate toxic metals (Odierna 1995; Yanochko et al. 1997; Jagoe et al. 1998;
280 Jeffree et al. 2001; Jeffree et al. 2005; Rainwater et al. 2002, 2007; Trillanes-Flores, 2013). Although a recent study
281 determined that most of the crocodiles from Rio Hondo exhibit a good body condition (Cedeño-Vazquez et al. 2011),
282 contamination by metals like Cd and Hg may represent a threat to the *C. moreletii* population in this area. These
283 contaminants may cause adverse effects that are not visually or externally measurable (e.g., reductions in fertility,
284 egg quality, hatchling health and survival) but still potentially hazardous to individuals and by extension populations.
285 In this study, heavy metals and MTs in blood plasma suggest recent exposure (Shaikh and Hirayama 1979; Shaikh
286 and Smith 1984). However, Hg in plasma suggests an accumulation in inner tissues, in addition to chronic exposure
287 to this metal (Burger et al. 2005). Therefore, to determine the type of exposure (recent or chronic) further studies of
288 heavy metals and MTs in blood fractions, urine, feces, caudal scutes, and internal tissues are required.

289 Interestingly, we observed a similar pattern in the concentrations of Cd and MTs, which could indicate a positive
290 correlation. The presence of MTs in blood plasma may fulfill the role of detoxification by binding Cd to form the
291 complex Cd-MT. However to support this finding, Cd-MT analysis is needed for a better understanding of
292 detoxification strategies.

293 Finally, as this is the first report of heavy metals and MTs in plasma of Morelet's crocodile in its natural
294 environment, it is recommendable to conduct studies with a larger and similar sample size by size classes, include
295 eggs collection and consider other metals (lead, copper, zinc, selenium and iron) in the analyses. Additionally, as the
296 first study for this species in Rio Hondo, long-term monitoring is essential to assess health and quality of habitat in
297 the basin.

298

299 **Acknowledgments**

300 This research was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT), El Colegio de la
301 Frontera Sur (ECOSUR), and Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)

302 (Project “Monitoreo del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala”). We thank
303 Fernando Gonzalez Avila, Raymundo Mineros Ramírez, Roberto Herrera Pavón and Irving Rosas López for field
304 assistance, and the family Rosas Carmona for providing support and accommodation during the surveys. We thank
305 Adriana Zavala for assistance in lab analyses. We thank Thomas R. Rainwater for his valuable comments on a
306 previous version of the manuscript. Research permits for this study were issued by the Dirección General de Vida
307 Silvestre (DGVs) of the Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (OFICIO
308 NÚM/SGPA/DGVs/04288/12, and OFICIO NÚM/SGPA/DGVs/00911/13).

309

310 **References**

- 311 Almlí B, Mwase M, Sivertsen T, Musonda MM, Flåøyen A (2005) Hepatic and renal concentrations of 10 trace
312 elements in crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Kafue and Luangwa rivers in Zambia. *Sci Total Environ*
313 337:75–82.
- 314 Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates:
315 their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76(2): 160–202.
- 316 Andreani G, Santoro M, Cottignoli S, Fabbri M, Carpenè E, Isani G (2008) Metal distribution and metallothionein in
317 loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci Total Environ* 390:287–294.
- 318 Bell JU, Lopez JM (1985) Isolation and partial characterization of a cadmium binding protein from the liver of
319 alligators exposed to cadmium. *Comp Biochem Physiol C* 82(1):123–8.
- 320 Bienengraber M, Forderkunnz S, Klein D, Summer KH (1995) Determination of Cu-containing metallothionein:
321 Comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal*
322 *Biochem* 228(1):69–73.
- 323 Brisbin Jr IL, Jagoe CH, Gaines KF, Gariboldi JC (1998) Environmental contaminants as concerns for the
324 conservation biology of crocodylians. *Crocodyles Proc 14th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*
325 Gland: SSC/IUCN pp. 155–73.
- 326 Bryan GW, Langston WJ (1992) Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special
327 reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ Pollut* 76(2):89–131.

328 Buenfil-Rojas M, Flores-Cuevas N (2007) Determinación de metales pesados (As, Cd, Hg y Pb) presentes en el Río
329 Hondo, Quintana Roo. In: VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales Chihuahua,
330 Mexico, pp 435–439.

331 Burger J, Gochfeld M, Rooney AA, Orlando EF, Woodward AR, Guillette LJ (2000) Metals and metalloids in
332 tissues of American alligators in three Florida lakes. Arch Environ Contam Toxicol 38:501–508.

333 Burger J, Campbell KR, Campbell TS, Shukla T, Jeitner C, Gochfeld M (2005) Use of skin and blood as nonlethal
334 indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). Arch Environ Contam
335 Toxicol 49(2):232–238.

336 Campbell JW, Waters MN, Tarter A, Jackson J (2010) Heavy metal and selenium concentrations in liver tissue from
337 wild American alligator (*Alligator mississippiensis*) livers near Charleston, South Carolina. J Wildl Dis
338 46(4):1234–1241.

339 Casas-Andreu G, Barrios-Quiroz G, Macip-Rios R (2011) Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en
340 Tabasco, México. Revista mexicana de biodiversidad 82(1):261–273.

341 Cedeño-Vázquez JR, Ross JP, Calmé S (2006) Population status and distribution of *Crocodylus acutus* and *C.*
342 *moreletii* in southeastern Quintana Roo, Mexico. Herpetol Nat Hist 10(1):17–30.

343 Cedeño-Vázquez JR, González-Ávila F, Castro-Pérez J (2011) Condición corporal del cocodrilo de pantano
344 (*Crocodylus moreletii*) en el Río Hondo, Quintana Roo, Mexico. Quehacer Científico en Chiapas 1(11):19–26.

345 Chan HM, Satoh M, Zalups RK, Cherian MG (1992) Exogenous metallothionein and renal toxicity of cadmium and
346 mercury in rats. Toxicology 76(1):15–26.

347 Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) (2012) Atlas digital de agua México. Sistema Nacional de Información
348 del Agua. Subdirección Técnica, CONAGUA.
349 <http://www.conagua.gob.mx/atlas/ciclo20.html>. Accessed 08 April 2014

350 Deb SC, Fukushima T (1999) Metals in aquatic ecosystems: Mechanisms of uptake, accumulation and release-
351 ecotoxicological. Int J Environ Stud 56:385–417.

352 Defew LH, Mair JM, Guzman HM (2005) An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves
353 from Punta Mala Bay, Pacific Panama. Mar Pollut Bull 50(5):547–552.

354 Delany MF, Bell JU, Sundlof SF (1988) Concentrations of contaminants in muscle of the American alligator in
355 Florida. J Wildl Dis 24(1):62–66.

356 Dobrovoljc K, Falnoga I, Žnidarič MT, Mazej D, Ščančar J, Bulog B (2012) Cd, Cu, Zn, Se, and metallothioneins in
357 two amphibians, *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). Biol Trace Elem
358 Res 150(1-3):178–94.

359 Euan-Avila JI, Liceaga-Correa MA, Rodriguez-Sanchez H (2002) Caracterización de fuentes no puntuales de
360 contaminación agrícola en el municipio de Othón P. Blanco en Quintana Roo y su potencial influencia en la
361 Bahía de Chetumal. In: Rosado-May FJ, Romero-Mayo R, De-Jesús-Navarrete A. Contribuciones de la ciencia
362 al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia. UQROO, Chetumal, Quintana
363 Roo, pp 197–204.

364 Fingerman M, Devi M, Reddy PS, Katyayani R (1996) Impact of heavy metal exposure on the nervous system and
365 endocrine-mediated processes in crustaceans. Zool Stud 35(1):1–8.

366 Garcia-Rios V, Gold-Bouchot G (2003) Trace metals in sediments from Bahía de Chetumal, Mexico. Bull Environ
367 Contam Toxicol 70(6):1228–1234.

368 Heaton-Jones TG, Homer BL, Heaton-Jones DL, Sundlof SF (1997) Mercury distribution in American alligators
369 (*Alligator mississippiensis*) in Florida. J Zoo Wildl Med 28(1):62–70.

370 Hidalgo J, Chung R, Penkowa M, Vašák M (2009) Structure and function of vertebrate metallothioneins. In: Metal
371 ions in life sciences, vol. 5. Royal society of chemistry, Cambridge, pp 279–317.

372 Jagoe CH, Arnold-Hill B, Yanochko GM, Winger PV, Brisbin Jr. IL (1998) Mercury in alligators (*Alligator*
373 *mississippiensis*) in the southeastern United States. Sci Total Environ 213(1):255–262.

374 Jeffree RA, Markich SJ, Twining JR (2001) Element concentrations in the flesh and osteoderms of estuarine
375 crocodiles (*Crocodylus porosus*) from the Alligator Rivers region, northern Australia: biotic and geographic
376 effects. Arch Environ Contam Toxicol 40: 236–245.

377 Jeffree RA, Markich SJ, Tucker AD (2005) Patterns of metal accumulation in osteoderms of the Australian
378 freshwater crocodile, *Crocodylus johnstoni*. Sci Total Environ 336: 71–80.

379 Lance VA, Cort T, Masuoka J, Lawson R, Saltman P (1995) Unusually high zinc concentrations in snake plasma,
380 with observations on plasma zinc concentrations in lizards, turtles and alligators. J Zool 235(4): 577–585.

381 Lehner AF, Rumbeiha W, Shlosberg A, Stuart K, Johnson M, Domenech R, Langner H (2013) Diagnostic analysis
382 of veterinary dried blood spots for toxic heavy metals exposure. J Anal Toxicol 37(7):406–422.

383 Magnon-Basnier C (2002) El río Hondo como componente hidrológico de la Bahía de Chetumal y como corredor
384 biológico compartido amenazado. In: Rosado-May FJ, Romero-Mayo R, De Jesús-Navarrete A. Contribuciones
385 de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia. UQROO, Chetumal,
386 Quintana Roo, pp 23–32.

387 Margoshes M, Vallee BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79:4813–4814.

388 Messel H, Vorlicek GC, Wells AC, Green WJ (1981) Surveys of tidal rivers systems in the Northern Territory of
389 Australia and their crocodile populations. Monograph N° 1. Sidney:Pergamon Press.

390 Nordberg M, Nordberg G (2009) Metallothioneins: Historical development and overview. In: Metal ions in life
391 sciences, vol. 5. Royal society of chemistry, Cambridge, pp 1–29.

392 Odierna E (1995) The occurrence of lead in Brazilian caiman as determined by atomic absorption spectrometry: a
393 potential ecological disaster. Dissertation. Manhattan College, USA.

394 Ortiz-Cervantes A, Rubio-Lozano R (2012) Reptiles. Características generales, biología y diversidad de especies. In:
395 Curso de cría, mantenimiento y patología de animales exóticos. University of Murcia, Spain, pp 27–30.

396 Perry EF, Koirtyohann SR, Perry Jr. HM (1975) Determination of cadmium in blood and urine by graphite furnace
397 atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem* 21(4):626–629.

398 Peters LJ (1983) Mercury accumulation in the American alligator. Dissertation. University of Florida.

399 Platt S, Rainwater T, Finger A, Thorbjarnarson JB, Anderson T, McMurry S (2006) Food habits, ontogenetic dietary
400 partitioning and observations of foraging behaviour of Morelet’s crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Northern
401 Belize. *Herpetol J* 16: 281–290.

402 Rainwater TR, Adair BM, Platt SG, Anderson TA, Cobb GP, McMurry ST (2002) Mercury in Morelet’s crocodile
403 eggs from Northern Belize. *Arch Environ Contam Toxicol* 324(1):319–324.

404 Rainwater TR, Reynolds KD, Cañas JE, Cobb GP, Anderson TA, McMurry ST, Smith PN (2005) Organochlorine
405 pesticides and mercury in cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*) from northeastern Texas, USA. *Environ*
406 *Toxicol Chem* 24(3): 665–673.

407 Rainwater TR, Wu TH, Finger AG, Cañas JE, Yu L, Reynolds KD, Coimbatore G, Barr B, Platt SG, Cobb GP,
408 Anderson TA, McMurry ST (2007) Metals and organochlorine pesticides in caudal scutes of crocodiles from
409 Belize and Costa Rica. *Sci Total Environ* 373(1):146–156.

410 Sánchez-Herrera O, Lopez-Segurajauregui G, Garcia-Naranjo-Ortiz de la Huerta A, Benitez-Diaz H (2011)
411 Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala.
412 CONABIO, 270 pp.

413 Sanchez-Rodriguez LH (2009) Comparación de dos métodos de determinación de mercurio total en cabello por
414 espectroscopías de absorción atómica con generador de hidruros y diferencial de efecto zeeman con pirolizador.
415 Dissertation. National University of Colombia.

416 Santucci B, Amantea A, Giuliano MC, Valenzano C, Cristaudo A (2000) Expression of metallothioneins-I and -II
417 isoforms at positive patch-test sites. Contact Dermatitis 43:103–106.

418 Scheuhammer AM, Cherian MG (1991) Quantification of metallothionein by silver saturation. Meth Enzymol
419 205:78–83.

420 Schneider L, Pacheco-Peleja R, Kluczkovski Jr. A, Martinez-Freire G, Marioni B, Vogt RC, Da-Silveira R (2012)
421 Mercury concentration in the spectacled caiman and black caiman (Alligatoridae) of the amazon: Implications
422 for human health. Arch Environ Contam Toxicol 63:270–279.

423 Schneider L, Maher W, Green A, Vogt RC (2013) Mercury contamination in reptiles: An emerging problem with
424 consequences for wild life and human health. In: Kim KH, Brown RJC (edit). Mercury: sources, applications
425 and health impacts. Nova science publishers, Inc. Chemistry research and applications, pp 173–232.

426 Shaikh ZA, Hirayama K (1979) Metallothionein in the extracellular fluids as an index of cadmium toxicity. Environ
427 Health Perspect 28:267–71.

428 Shaikh ZA, Smith, LM (1984) Biological indicators of cadmium exposure and toxicity. Experientia 40(1):36–43.

429 Sigler L, Cedeño-Vázquez JR, Cupul-Magaña FG (2011) Método de detección visual nocturna (DVN). In: Sánchez-
430 Herrera, O., López-Segurajauregui, G., García-Naranjo-Ortiz-de-la-Huerta, A., Benítez-Díaz, H. (comps).
431 Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. México.
432 Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

433 Smith PN, Cobb GP, Godard-Codding C, Hoff D, McMurry ST, Rainwater TR, Reynolds KD (2007) Contaminant
434 exposure in terrestrial vertebrates. Environ Pollut 150:41–64.

435 Trillanes-Flores CE (2013) Análisis de minerales no esenciales en escamas de *Crocodylus moreletii* en Campeche
436 México. M Sc thesis. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). México. 95 p.

437 Triunfante P, Soares ME, Santos A, Tavares S, Carmo H, Bastos ML (2009) Mercury fatal intoxication: Two case
438 reports. *Forensic Sci Int* 184:e1–e6.

439 Van-deer-Oord JJ, De-Ley M (1994) Distribution of metallothionein in normal and pathological human skin. *Arch*
440 *Dermatol Res* 286:62–68.

441 Vázquez FJ (2005) Toxicidad comparada de zinc, plomo y mercurio para Zoea I de *Chasmagnathus granulatus*
442 (Brachyura). Tesina de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano. Argentina. 29 p.

443 Wolfe MF, Schwarzbach S, Sulaiman RA (1998) Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environ*
444 *Toxicol Chem* 17(2): 146–160.

445 Woodward AR, Marion WR (1978) An evaluation of factors affecting night-light counts of alligators. *Proceedings of*
446 *the annual conference southeastern association fish and wildlife agencies*, 32:291-302.

447 Xu Q, Fang S, Wang Z, Wang Z (2006) Heavy metal distribution in tissues and eggs of Chinese alligator (*Alligator*
448 *sinensis*). *Arch Environ Contam Toxicol* 50:580–586.

449 Yamamura M, Suzuki KT (1984) Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise *Clemmys*
450 *mutica*. *Comp Biochem Physiol C* 79:63–9.

451 Yanochko GM, Jagoe CH, Brisbin Jr IL (1997) Tissue mercury concentrations in alligators (*Alligator*
452 *mississippiensis*) from the Florida Everglades and the Savannah River Site, South Carolina. *Arch Environ*
453 *Contam Toxicol* 32: 323–8.

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463 Table 1. Sample size (N) by transect, sex ratio, and total length of Morelet's crocodiles sampled in this study.

Transect	N		Male:female:undetermined	Total length (cm)	
	Scutes	Plasma		Mean (\pm SD)	Range
Pucte	9	5	3:4:2	90.91 \pm 62.33	33.5 – 190.5
Cocoyol	7	2	5:2:0	89.93 \pm 47.03	32 – 150.7
La Unión	8	6	4:3:1	91.03 \pm 37.51	32 – 125.5

464

465

466

467

468 **Table 2.** Mean (\pm SD) concentrations of Cd and Hg* and MTs (μ g/ml wet weight) detected in blood plasma and
469 caudal scutes of Morelet's crocodiles in three transect of Rio Hondo.

Tissue	Transect	Cd	Hg	MTs
Blood plasma	Pucte	12.77 \pm 14.49	20 \pm 12.73	16.58 \pm 10.99
	Cocoyol	7.51 \pm 2.06	ND	19.1
	La Union	2.59 \pm 2.79	8.25 \pm 5.79	6.48 \pm 4.72
Caudal scutes	Pucte	11.66 \pm 5.66	260.71 \pm 164.84	ND
	Cocoyol	85.2 \pm 83.57	232.8 \pm 100.7	ND
	La Union	26.27 \pm 15.76	561.63 \pm 635.63	ND

470 * Concentrations of heavy metals in blood plasma given in ng/ml (wet weight) and in scutes in ng/g (wet weight).

471 ND = non-detected.

472

473

474

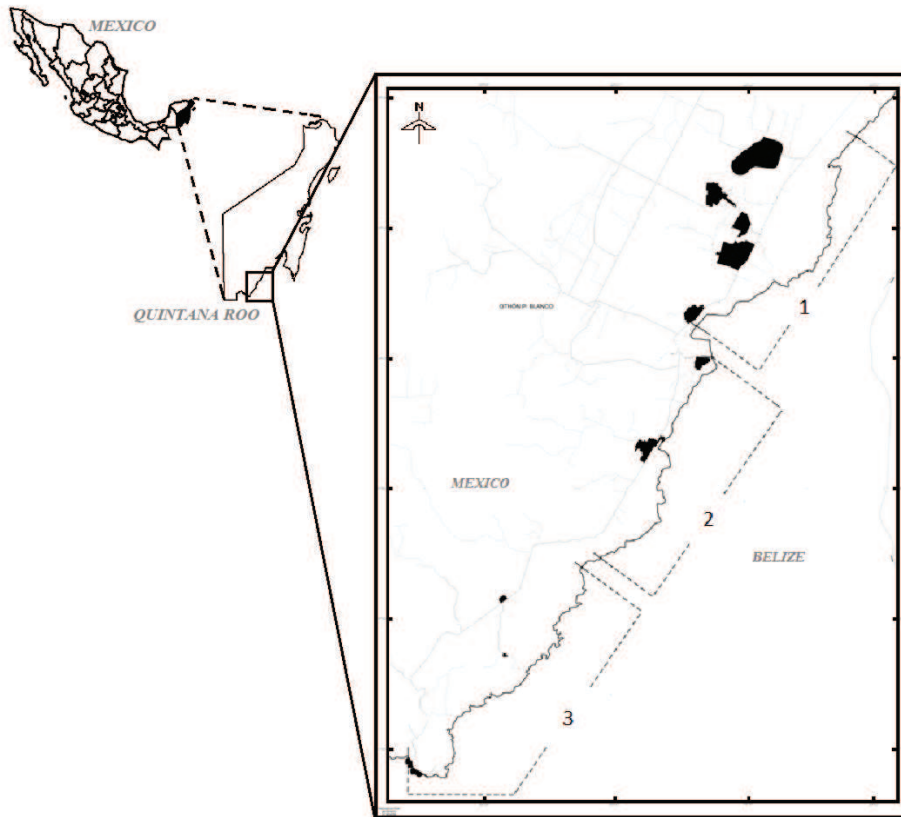
475

476 **Table 3.** Mean (\pm SD) concentrations of cadmium and mercury (wet mass) detected in caudal scutes of Morelet's
477 crocodiles in Rio Hondo and additional locations in northern Belize.

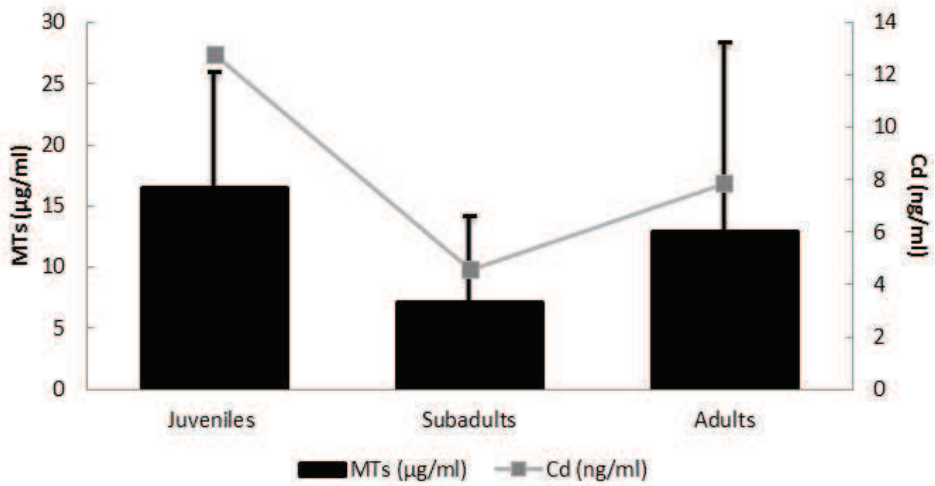
Location	N	Cadmium (ng/g)	Mercury (ng/g)	Reference
Gold Button Lagoon, Belize	9	ND	98.7 \pm 21.6	Rainwater et al. (2007)
New River Watershed, Belize	10	70.7 \pm 45.7	72.7 \pm 20.4	Rainwater et al. (2007)
Pucte, Rio Hondo	9	11.7 \pm 5.7	260.7 \pm 164.8	This study
Cocoyol, Rio Hondo	7	85.2 \pm 83.6	232.8 \pm 100.7	This study
La Union, Rio Hondo	8	26.3 \pm 15.8	561.63 \pm 635.6	This study

478

479



480
 481 **Figure 1.** Map of Rio Hondo showing the three transects surveyed during this study, Pucte (1), Cocoyol (2), and La
 482 Union (3).



484
 485 **Figure 2.** Mean concentrations of Cd and MTs in the three size classes.