



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA



EXPRESIÓN DE MT1 EN PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*) COMO
INDICADOR DE EXPOSICIÓN A METALES Y EL PAPEL DEL SNP
RS8052394 EN EL GEN MT1A EN LA TOXICIDAD DE METALES EN
HUMANOS.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
HEIDY GALILEA DOLORES RAYMUNDO

DIRECTORA: Dra. WENDY ARGELIA GARCÍA SUASTEGUI
CODIRECTOR: Dr. LUCIO ANTONIO RAMOS CHÁVEZ

ABRIL, 2025.

Agradecimientos

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por el apoyo brindado, que permitió contar con los recursos adecuados para obtener resultados relevantes.

Al **Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción** que me abrió las puertas de sus instalaciones, lo que me permitió la realización de los experimentos fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A la **Dra. Wendy Argelia García Suastegui**, quien estuvo a cargo de la dirección de este proyecto, por su invaluable orientación, apoyo constante y experiencia, que fueron fundamentales para el desarrollo y culminación exitosa de esta investigación. Su liderazgo y conocimientos han sido esenciales en cada etapa del proceso.

Al **Dr. Lucio Antonio Ramos Chavez** Profesor del Instituto Nacional de Psiquiatría, quien fungió como coasesor de la presente investigación, sus valiosas aportaciones fueron cruciales para el avance y éxito de este trabajo.

A la **Dra. Vianey Marín Cevada** y al **Dr. José Luis Morán Perales**, por sus valiosas contribuciones y observaciones, que desempeñaron un papel clave en el fortalecimiento y enriquecimiento de este trabajo.

Al **Mtro. en Ciencias Azahel Piña López**, por su amable ayuda en la realización de los mapas en la presente investigación.

Dedicatoria

A Dios, por regalarme grandes dones y poner en mi vida a las personas indicadas.

A mis padres, porque son mi mayor apoyo, mi motor y motivación. Gracias por impulsarme a perseguir mis sueños, incluso lejos de casa. No hay nada que me llene más el corazón que saber que se sienten orgullosos de mí.

Papá, gracias por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme a mirar el mundo con curiosidad y a poner el corazón en lo que hago.

Mamá, gracias por confiar siempre en mí, por sanar mi corazón incluso desde la distancia siempre que lo necesité, y por enseñarme, con tu ejemplo, a ser una mujer fuerte.

A mis hermanos, los mejores compañeros de vida que podría haber deseado.

Hiram, gracias por creer tanto en mí; deseo con todo el corazón poder ser un ejemplo para ti.

Adi, gracias por ser la mejor roomie que Dios me regaló, gracias por los consejos, por las aventuras, por cocinarme y cuidarme, por ser mi cómplice incondicional desde el día 1. Sin ti no habría podido sobrevivir a la vida foránea.

A mis amigas y amigos: Aylin y Lilia, porque hemos estado juntas desde la secundaria y han estado ahí para festejar cada uno de mis logros. Gracias por ser mujeres que me inspiran y por llenar mi vida no solo de risas, sino también de motivación.

Eren, gracias por ser la mejor amiga que la universidad me regaló. Gracias por tu apoyo infinito; sé que nos esperan grandes cosas como mujeres de ciencia y quiero seguir celebrando juntas esos logros.

Gaby, porque has sido mi alma gemela desde la secundaria y, a pesar de la distancia, siempre has estado ahí para mí.

Giezi, el mejor amigo y compañero desde kínder hasta la universidad, sin duda eres un regalo de Dios. Siempre voy a admirarte mucho.

Julio, gracias por cuidarnos tanto; has sido el mejor vecino que pudimos haber deseado.

A la Bióloga Martha Elena, gracias por sembrar en mí el amor a la investigación

científica, por ser la asesora de mis primeros proyectos de investigación y confiar en mi potencial desde la secundaria. Espero, algún día, ser una gran científica como usted.

A todos los que hicieron de mi etapa universitaria una de las mejores experiencias de mi vida: los llevo guardados en el corazón. Gracias por hacer de la universidad y de la vida foránea el capítulo más hermoso —hasta ahora— de mi vida. Gracias, por tanto.

Contenido

Tabla de contenido

RESUMEN.....	1
1. MARCO TEORICO E INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metales.....	1
1.2 Contaminación por metales pesados	2
1.3 Metalotioneínas y su relación con la desintoxicación.....	4
1.4 Metalotioneínas como biomarcadores de exposición a metales en peces.....	9
1.4.1 El pez cebra como modelo experimental.....	11
1.4.2 Western Blot: técnica para la identificación de Metalotioneínas como biomarcadores de exposición	14
1.5 Metalotioneínas como biomarcadores de susceptibilidad en humanos	15
1.5.1 Polimorfismos genéticos.....	15
1.5.2 RFLP: Técnica para la identificación de polimorfismos de metalotioneína en humanos	15
2. ANTECEDENTES.....	15
3. PLANTEAMIENTO	15
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	17
5. HIPÓTESIS.....	17
6. OBJETIVO GENERAL.....	17
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
8. METODOLOGÍA.....	18
8.1 Expresión de MT1 en <i>Danio rerio</i> expuestos a iones de metales pesados en el agua de la REFB.....	18
8.1.1 Área de estudio:.....	18
8.1.2 Medición de metales pesados en el agua de los jagüeyes	20
8.1.3 Bioensayo con <i>Danio rerio</i>	21
8.1.4 Análisis estadístico.....	24
8.2 Genotipificación del polimorfismo de MT1A por PCR-RFLP.....	24
8.2.1 Área de estudio:.....	24
8.2.2 Selección de la población.....	27
8.2.3 Obtención de las muestras biológicas	27
8.2.4 Medición de Pb en sangre.....	28

8.2.5 Purificación de ADN.....	28
8.2.6 PCR-RFLP	29
8.2.7 Análisis estadístico.....	29
9 RESULTADOS.....	30
9.1 Análisis de la presencia de metales en el agua de los jagüeyes analizados de la REFB	30
9.2 Western Blot para expresión de MT1 en hígado y branquia de <i>Danio rerio</i>	33
9.3 Correlación entre concentración de metales y expresión de MT1 en <i>Danio rerio</i>	34
9.4 Datos demográficos de los habitantes encuestados de las zonas de estudio	37
9.5 Análisis comparativo de niveles de Pb en sangre en individuos de 4 localidades mexicanas	42
9.6 PCR-RFLP <i>in silico</i> del sitio polimórfico del gen MT1A humano.....	43
9.7 Prevalencia de la variante rs8052394 (A 152 G) en MT1A por PCR-RFLP en población mexicana.....	44
10. DISCUSIÓN.....	47
10.1 Concentraciones de metales pesados en los jagüeyes de la REFB	47
10.2 Expresión de MT1 en <i>Danio rerio</i>	49
10.3 Altos niveles de Pb en Sangre de habitantes de 4 municipios en los Estados de Hidalgo y México	53
10.4 Impacto del polimorfismo rs8052394 del gen MT1A en humanos	54
11. CONCLUSIONES	59
12. REFERENCIAS.....	60
13. ANEXOS.....	68

RESUMEN

1. MARCO TEORICO E INTRODUCCIÓN

1.1 Metales

La historia de la humanidad ha estado estrechamente vinculada al uso de diversos metales, como el cobre, la plata, el oro y el hierro, que han sido fundamentales en la fabricación de herramientas y armas mediante procesos de fundición y moldeado. Con la Revolución Industrial, se perfeccionaron técnicas como la fundición del acero y se incorporaron otros metales, como el zinc, el níquel y el platino, en la construcción de máquinas. Además de su utilidad en la industria, algunos metales son esenciales para el funcionamiento de las células, ya que actúan como cofactores en reacciones enzimáticas o forman parte de importantes macromoléculas. Por ejemplo, el cromo III desempeña un papel en el metabolismo de lípidos y glucosa; el hierro es crucial en la síntesis de hemoglobina y actúa como cofactor de enzimas como la catalasa, la peroxidasa y la citocromo-oxidasa; el zinc se encuentra en enzimas como las polimerasas, deshidrogenasas, peptidasas y anhidrasas; el selenio tiene propiedades antioxidantes, especialmente para los lípidos; y el estroncio participa en la calcificación de huesos y dientes, entre otros (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

La exposición de los seres vivos a diversos metales en concentraciones elevadas ya sea por la vía alimentaria, ingestión de agua o inhalación, se debe a las altas concentraciones naturales, la contaminación o el uso de utensilios metálicos. La exposición ocupacional de los obreros metalúrgicos evidenció la relación entre la exposición a metales y el desarrollo de algunas neoplasias. Posteriormente, fue posible correlacionar los niveles elevados de metales en la atmósfera, provenientes de actividades industriales, con el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas en los seres humanos (Aguilar Méndez, 2021). La inhalación y la ingestión de metales son las rutas de exposición más efectivas para su bioacumulación; sin embargo, también se observan efectos tóxicos por contacto dérmico y mucoso. Se ha demostrado que muchos metales son mutágenos y carcinógenos en mamíferos, como el cadmio, que se utiliza en la elaboración de pigmentos, insecticidas y otros productos. Una fuente adicional de exposición al

cadmio proviene de las emisiones de motores de combustión interna, y también se encuentra en el humo del tabaco (Nava-Ruiz, *et al.*, 2011)

El cromo es un metal esencial en cantidades muy pequeñas para los seres vivos, y en el organismo se transforma de Cr-VI a Cr-III. Sin embargo, en concentraciones elevadas, el cromo interactúa con los ácidos nucleicos, induciendo mutaciones y contribuyendo al cáncer pulmonar (Montoya, *et al.*, 2010).

El plomo es un metal presente en altas concentraciones en la atmósfera de zonas urbanas, y se utiliza como recubrimiento en cerámica y otros utensilios de cocina. El Pb interfiere en la biosíntesis del grupo hemo de la hemoglobina, al competir con el hierro e incorporarse en su lugar, lo que causa anemia, linfomas, carcinomas y sarcomas renales, además de ser un agente mutágeno (Montoya, *et al.*, 2010)

El mercurio se incorpora fácilmente en los seres vivos y tiende a biomagnificarse en la cadena alimentaria. Se conocen varios casos de intoxicación en humanos por metilmercurio debido al consumo de pescados y mariscos contaminados (Cadavid-Muñoz, 2020).

El níquel es un metal tóxico cuya principal fuente de exposición son los alimentos, especialmente pescados y vegetales regados con aguas residuales. También se encuentra en utensilios de acero inoxidable, algunas monedas y joyas recubiertas o fabricadas con aleaciones de níquel. Este metal está asociado con carcinoma nasal y actúa como agente mutágeno (Olivares-Arias, *et al.*, 2015).

1.2 Contaminación por metales pesados

Este tipo de contaminación causa numerosos problemas, tanto para las plantas y organismos acuáticos, como para los humanos, ya que al irse acumulando gradualmente en ciertas plantas y animales, interfieren con su actividad metabólica y la de sus consumidores cuando son ingeridos a través de la cadena alimentaria llegando incluso a sufrir desde erupciones cutáneas, problemas estomacales y respiratorios, debilitamiento del sistema inmunológico, daño renal y hepático, hasta cáncer de pulmón, afecciones cardíacas, óseas, testiculares y del sistema nervioso, e incluso la muerte (Pabón *et al.*, 2021; Sheykhi & Moore, 2013).

Los metales pesados son elementos químicos que presentan densidades superiores a 4 g/cm^3 y tienen una masa y peso atómico mayores a 20. Estos elementos pueden ser tóxicos incluso en concentraciones bajas. Los metales pesados más conocidos son: Zinc (Zn), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Mercurio (Hg) y Cromo (Cr) (Lodoño, 2016). Estos metales poseen la capacidad de bioacumularse, debido a que no son biodegradables, proceso en el que una sustancia, se acumula en un organismo vivo a lo largo del tiempo. Estos compuestos se almacenan más rápidamente de lo que pueden ser metabolizados o excretados (Sonone *et al.*, 2021).

La toxicidad a nivel molecular de los metales pesados se debe principalmente al inhibir enzimas debido al bloqueo de grupos funcionales esenciales mediante su interacción con los grupos sulfhidrilo (SH), específicamente a los residuos de cisteína, como ocurre con las enzimas involucradas en la producción de energía celular; de igual forma provocan el desplazamiento de centros catiónicos en enzimas como la ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (rubisco), la cual cuenta con un centro catiónico de Mg^{2+} el cual es sustituido en presencia de cationes divalentes como Ni^{2+} y Zn^{2+} . Además, metales como Cu^+ sufren autooxidación lo que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que puede causar estrés oxidativo en las células (Ali & Khan, 2018., Covarrubias & Peña-Cabriales, 2019).

Los metales pesados se vuelven dañinos al convertirse en radicales libres cuando sus electrones se separan. Para estabilizarse, estos radicales buscan capturar electrones de las partes celulares cercanas. Cuando la cantidad de radicales libres aumenta demasiado, los mecanismos protectores de la célula que donan electrones, como las MT en células de vertebrados, dejan de proteger el cuerpo, lo que puede llevar a un envejecimiento rápido y degeneración (Chang, 2004).

Covarrubias y Peña-Cabriales (2019) señalan que en México ya existen diversos informes que indican la presencia de metales pesados en ríos, lagos, cultivos, suelos y el aire de áreas rurales y urbanas, así como en entornos costeros y marinos, siendo los principales contaminantes debido a su toxicidad y abundancia, el Hg, Pb y en algunos lugares el Cr.

1.3 Metalotioneínas y su relación con la desintoxicación

Como se ha descrito anteriormente, algunos iones metálicos tienen un papel clave en la transferencia de energía celular, la señalización y otras funciones esenciales; no obstante, niveles elevados pueden resultar tóxicos para las células. Para hacer frente a esto, las células han desarrollado mecanismos de defensa contra los metales: el transporte de metales a través de la membrana y la quelación dentro de la célula. La MT es un quelante que responde a estos estímulos (Yang, *et al.*, 2024).

Las metalotioneínas (MT) son proteínas pertenecientes a la familia de las metaloproteínas y están compuestas por aproximadamente 60 aminoácidos, ninguno de los cuales es aromático. Tienen una masa molar de entre 6 y 7 kDa y un alto contenido de residuos de cisteína que no forman puentes disulfuro, permitiendo así su unión a metales pesados (Castellanos-Leguizamón, 2022; Costa & Costa, 2008). Dichas proteínas se aislaron por primera vez en 1957 por Margoshes y Vallee a partir de riñón de caballo. Posteriormente, en 1960, Kägi y Vallee las caracterizaron y lograron purificar una proteína que contenía altos niveles de cadmio (Cd), zinc (Zn) y azufre (S). Esta proteína representaba el 1% del peso total de la corteza renal del caballo, y se estimó que todo el cadmio y el 60% del zinc estaban unidos a ella (García-Rico *et al.*, 1999). Tiempo después, se aisló en los principales grupos de invertebrados, incluyendo nematodos, anélidos, artrópodos, equinodermos y moluscos. Actualmente se conoce que las MT se encuentran en todas las formas de vida y están ampliamente conservadas en eucariotas superiores, desde bacterias hasta mamíferos, con variaciones en su contenido de cisteína, que puede oscilar entre el 25% y el 30%. Encontrándose principalmente en el citoplasma celular, aunque también se han detectado en el núcleo y los lisosomas. Aunque están presentes en una gran variedad de tejidos, predominan en el hígado y los riñones de los vertebrados, así como en la glándula digestiva y el intestino de los invertebrados (Ureña-Robles, 2007; Castellanos-Leguizamón, 2022; Costa & Costa, 2008., Lemus *et al.*, 2016).

La presencia de diversas isoformas de MT en algunas especies, con diferencias mínimas en su estructura primaria pero suficientes para distinguirlas en términos de carga total de proteína, indica un polimorfismo genético (Kägi y Kojima, 1987). La nomenclatura adoptada para las isoformas de MT (isoMT) sigue las recomendaciones de la IUPAC-IUB (Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes) y se numera según la

secuencia de elución en resinas de intercambio iónico (MT-1, MT-2, MT-3, etc.). Las sub-isoformas se representan con letras (MT-1A, MT-1B, etc.) (Juárez-Rebollar & Méndez-Armenta, 2014).

En todos los vertebrados los genes de MT están constituidos por una región 5' flanqueante (5'UT), una región no traducida (5'UTR), 3 exones separados por dos intrones y una región 3' flanqueadora. La región 5' no traducida contiene elementos reguladores en posición cis entre los cuales hay una o más copias de sitios promotores con elementos de respuesta a metales (MRE). La transcripción de estos genes es mediada por el factor de transcripción MTF-1, el cual requiere altas concentraciones de zinc para unirse al ADN. Inicialmente, MTF-1 está inhibido por el inhibidor de la transcripción de metal (MTI), pero en presencia de zinc se libera y puede activar la transcripción de las MT al unirse al MRE. Esta regulación de la transcripción de las MT a través de MTF-1/MRE está conectada con múltiples cascadas de señalización celular que afectan la fosforilación de MTF-1. La inhibición de proteínas quinasas como la proteína quinasa C puede reducir los niveles de MT, sugiriendo una compleja regulación de esta proteína en respuesta a diferentes señales celulares (Lemus *et al.*, 2016; Tapia-Alamos, 2002).

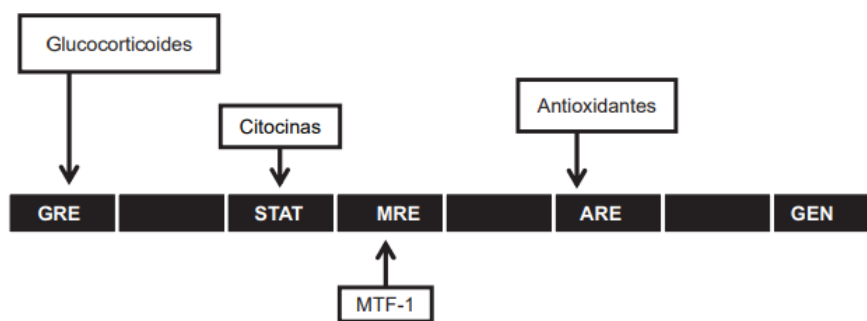


Imagen 1. Mapa del gen de MT, las secuencias regulatorias responden a distintos estímulos como factores fisiológicos, estresores ambientales y iones de metales pesados. Fuente: Juárez-Rebollar & Méndez-Armenta, 2014.

Las MT responden a diversos estímulos y su expresión se regula a nivel de la transcripción, siendo inducida por factores fisiológicos, estresores ambientales y iones de metales pesados (Imagen 1 y Tabla 1), siendo comprobado ya, que juegan un papel crucial en la absorción y eliminación de estos metales, puesto que son ellos sus inductores más potentes (Lemus *et al.*, 2016., Chan *et al.*, 2006).

Tabla 1. Factores que inducen la síntesis de las metalotioneínas.

Factores	Ejemplos
Iones metálicos	Cd, Zn, Mg, Cu, Hg, Pb, Cr, Bi, Ni, Ag, Co.
Factores de estrés	Temperaturas elevadas; exposición a radiación X y UV; elevada presión parcial de O ₂ ; falta de alimento; infección; estrés físico; hipotermia; alteración de la salinidad.
Hormonas y mensajeros secundarios	Glucocorticoides; progesterona; estrógeno; insulina; glucagón; adenosina; AMPc; diacilglicerol.
Agentes inflamatorios	Lipopolisacáridos; dextrano; endotoxina.
Agentes citotóxicos	Etanol; butirato; agentes alquilantes; ácidos grasos; cloroformo; di(2-etilexil) ftalato; tetracloruro de carbono; formaldehído; etionina; uretano; D-penicilamina; estradiol.

Fuente: Ureña-Robles, 2007.

Cuando la concentración de iones metálicos libres en el interior de la célula aumenta, se activa la transcripción de los genes de MT, lo que lleva a una mayor producción de estas y, en consecuencia, a una disminución de la concentración de metales intracelulares al unirse con estas proteínas. En el proceso de detoxificación de metales, las MT transforman especies metálicas tóxicas, como el mercurio en su forma altamente tóxica de metilmercurio, en formas menos tóxicas al secuestrarlas, reduciendo así la biodisponibilidad de los metales dentro de la célula (Chan, 2004).

Brambila y González (1993) mencionan que, aunque la concentración óptima del metal para iniciar el proceso de inducción de las MT varía entre los diferentes organismos, generalmente se presenta justo por debajo del nivel que causa toxicidad celular. Ellos describen el proceso de inducción de la siguiente manera: la célula blanca es expuesta a glucocorticoides o metales, los cuales tienen una capacidad de inducción de las MT entre 20 y 50 veces mayor, después la síntesis de ARN mensajero de la apometalotioneína alcanza un estado estacionario a las 4 horas, para

que posteriormente la síntesis de las MT se vea estimulada (Imagen 2), observándose un incremento entre las 2 y 4 horas posteriores a la exposición. Si se eliminan los inductores, los niveles de MT disminuyen, con una vida media de 12 a 22 horas, y los niveles basales de MT regresan a sus valores iniciales entre 48 y 72 horas.

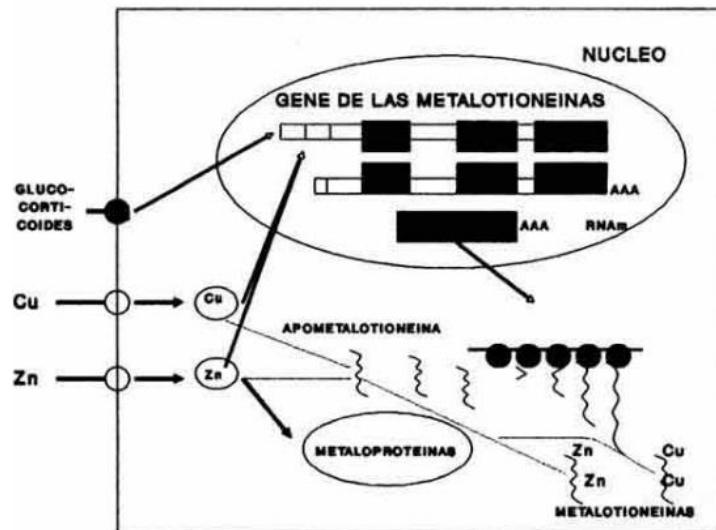


Imagen 2. Secuencias de control transcripcionales en los genes de MT humana. Fuente: Brambila y González, 1993.

Es la distribución característica de residuos de cisteína en las MT la que determina cómo estas proteínas se unen a los metales. Esto se logra mediante la formación de agrupaciones de tiolatos en sus dos partes: el dominio α , que está en el extremo C-terminal y es más estable, y el dominio β , ubicado en el extremo N-terminal y más reactivo. Estas estructuras permiten que cada molécula de MT pueda unir hasta 7 iones metálicos divalentes o 12 iones metálicos monovalentes, organizados en dos configuraciones diferentes (Imagen 3) (Chang, 2004).

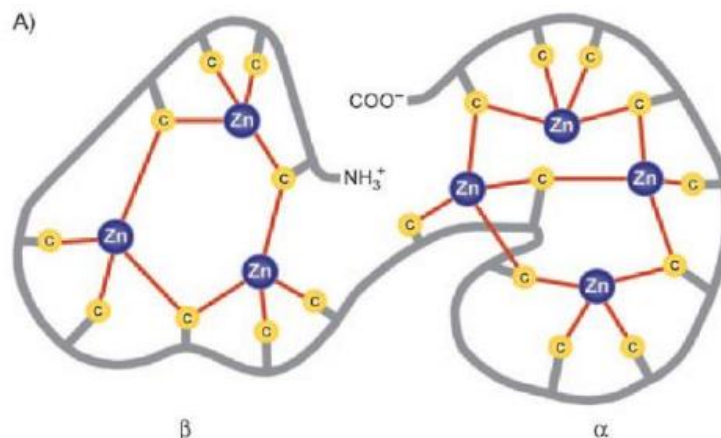


Imagen 3. Dominos α con cuatro sitios de unión y dominio β con tres sitios de unión a iones metálicos de MT unida a Zn. Fuente: Rodríguez-Evangelista, 2011.

En condiciones fisiológicas, las MT se asocian principalmente con el Zn, siendo el exceso de este metal el que induce su expresión, mientras que las condiciones de agotamiento de dicho metal hacen que las MT liberen Zn como un medio para equilibrar el acervo intracelular de este metal en respuesta a los estados redox y energéticos celulares (Monteith & Skaar, 2021). Aunque también tienen una afinidad notablemente alta por metales pesados potencialmente tóxicos. Diversas investigaciones señalan que hasta 18 metales diferentes pueden asociarse con las MT. Sin embargo, la afinidad de unión varía entre ellos y aún no está claramente definida, ya que distintos autores discrepan sobre cuál metal posee la mayor afinidad. Coyle (2002) menciona al Cu como el metal que presenta la mayor constante de estabilidad, seguido del Cd, por su parte, López (2007) nos menciona que tanto el Cd como el Hg pueden reemplazar al Zn y/o Cu.

Por otro lado, Waalkes y su equipo definen el orden de afinidad de las MT por los metales de la siguiente manera: Cd > Pb > Cu > Hg > Zn > Ag > Ni > Co.

Aunado a esto, debido a que la expresión de MT responde a diversos estímulos (Tabla 1), estas proteínas cumplen con diversas funciones en los organismos, como efecto antioxidante, efecto neuroprotector, efecto anticancerígeno y efecto antiinflamatorio (Imagen 4) (Yang, *et al.*, 2024).

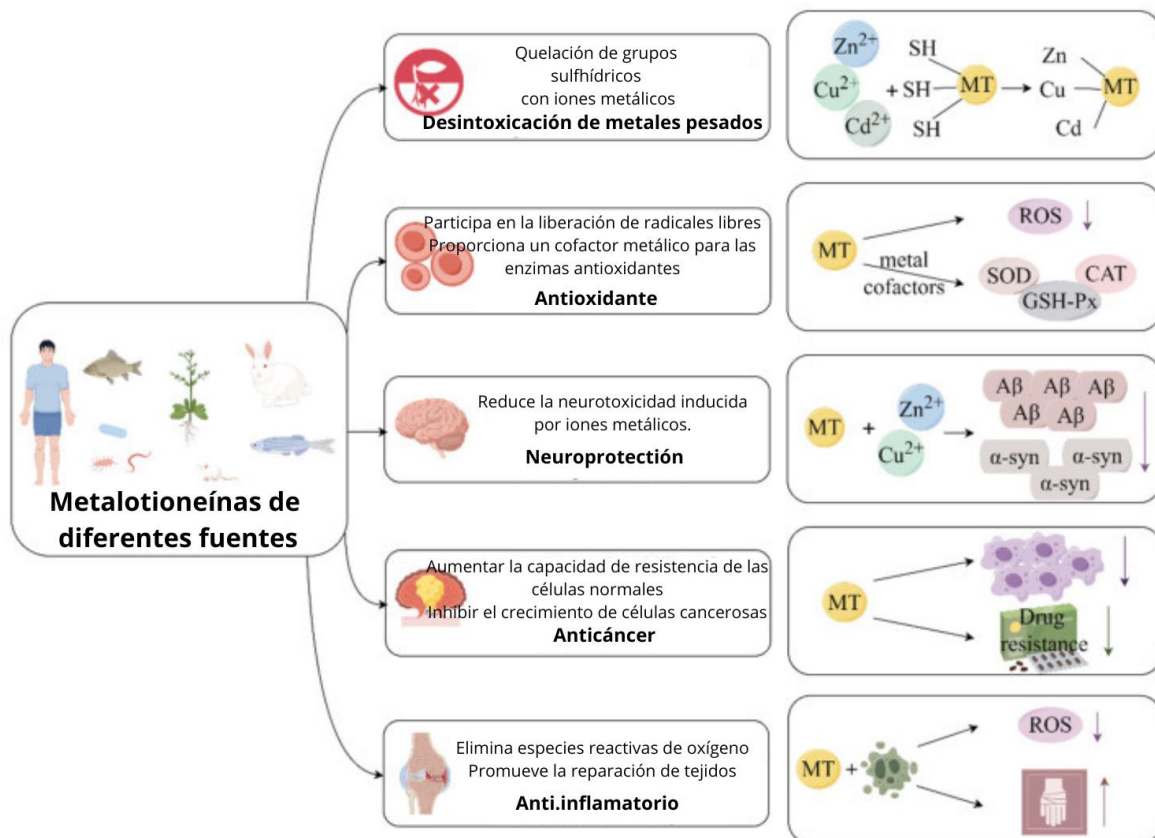


Imagen 4. Funciones de la MT en diversos organismos. Fuente: Modificado de Yang, *et al.*, 2024.

1.4 Metalotioneínas como biomarcadores de exposición a metales en peces

En peces, las MT presentan 20 residuos de cisteína que están conservados de manera notable, dispuestos típicamente en patrones como Cys-X-Cys o Cys-X-X-Cys (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína) y son estas configuraciones las que tienen una fuerte atracción por los iones metálicos divalentes (Chan, 2004).

Scudiero *et al.*, 2005 menciona que basado en estudios estructurales se ha demostrado que existen diferencias clave entre las MT de peces y mamíferos. Por ejemplo, el noveno residuo de cisteína en el dominio α de la MT de peces se desplaza en dos posiciones en comparación con la de mamíferos, lo que provoca un cambio en la conformación de la proteína. Además, la MT de peces es menos hidrófoba y más flexible que la de mamíferos. De igual forma, se han observado diferencias en la reactividad y capacidad de intercambio de metales entre las MT de peces y mamíferos.

Ya se han caracterizado las regiones promotoras de los genes que codifican las MT en varias especies de peces, y se ha encontrado que todas comparten la presencia de MRE en las zonas distal y proximal, las cuales juegan un papel en la inducción de MT por metales (Ureña-Robles, 2007).

El interés en los metales como contaminantes ambientales y la necesidad de comprender los mecanismos asociados con su toxicidad han sido los principales impulsores en el estudio de estas moléculas (Ureña-Robles, 2007). Actualmente las MT se han utilizado ampliamente como biomarcadores de la respuesta a la exposición a metales y para evaluar la exposición histórica a la contaminación por metales pesados, por lo que la regulación génica de las MT por iones de metales pesados ha sido investigada en varias especies de peces, como el lenguado, las carpas, la tilapia y el pez cebrá para poder estudiar este tipo de contaminación en entornos acuáticos (Lemus *et al.*, 2016., Chan *et al.*, 2006).

En diversos estudios, tras la inyección intraperitoneal de metales en peces, se observó un incremento en la expresión de MT en varios órganos. También se ha demostrado que los niveles de dicha proteína aumentan en función de la dosis de metal administrada o del tiempo transcurrido después de la administración (Ureña-Robles, 2007). En el caso particular del pez cebrá, Chen y colaboradores (2007) investigaron el impacto del Zn y Cd en la expresión de MT (Imagen 5) durante el desarrollo larval temprano. Utilizando hibridación *in situ*, observaron cambios en el patrón de expresión tras el tratamiento con ZnCl₂ (100 µM), mostrando una inducción significativa en varias regiones como la fosa olfatoria, el cerebelo, la retina, las células cloro y la vena cardinal común. A las 96 hpf (horas post fertilización), el cerebelo y el hígado presentaron una señal intensa, aunque la intensidad en el cerebelo disminuyó a las 120 hpf. En el caso del Cd (5 µM), también incrementó la expresión de MT, especialmente en la fosa olfatoria a las 48 y 72 hpf, y en otras regiones como las branquias y neuromastos de la línea lateral a las 96 y 120 hpf. Estos resultados sugieren que tanto el Zn como el Cd modifican temporal y espacialmente la expresión de MT durante el desarrollo larval, indicando su influencia en la regulación genética de dicho pez.

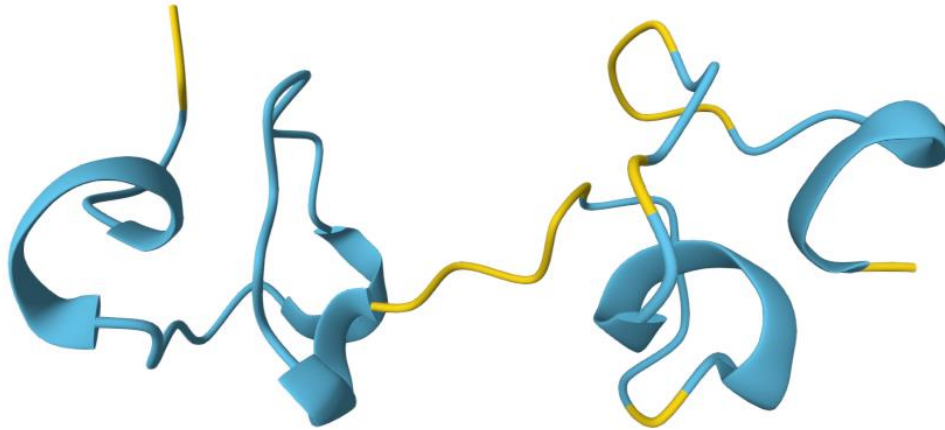


Imagen 5. Estructura 3D de Metalotioneína-1 en *Danio rerio* (60 aa).

Fuente: Uniprot,2024.

Existen pocos experimentos en peces que hayan involucrado la exposición ambiental a metales disueltos en el agua, sin embargo, estos estudios también han mostrado una inducción de MT en estos organismos. La evaluación de dicha inducción en condiciones naturales es más compleja, ya que las circunstancias ambientales y fisiológicas de los peces no están tan controladas, por lo tanto, es fundamental considerar tanto los factores endógenos como exógenos que influyen en la inducción de MT (Ureña-Robles, 2007).

1.4.1 El pez cebra como modelo experimental

Un organismo modelo se refiere a una especie no humana que es ampliamente estudiada por la comunidad científica con el objetivo de entender procesos biológicos específicos. Esto permite obtener una visión de lo que ocurre en organismos similares o más complejos que el modelo estudiado (Ponce-Palomera *et al.*, 2023).

En este contexto, el pez cebra (*Danio rerio*), un pez de tamaño pequeño (3 cm X 2 cm X 1 cm) dulceacuícola, miembro de la familia *Cyprinidae* originario de ríos de la India y está distribuido en regiones de Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistán, ha sido utilizado como modelo biológico experimental en diversas áreas científicas para realizar evaluaciones toxicológicas, aplicaciones médicas, entre otras, esto gracias a las similitudes de su genoma con el humano, contando con un genoma con 25 pares de cromosomas y alrededor de 26,000 genes que codifican proteínas y con más del 70% de sus genes teniendo versiones similares entre este pez y el ser humano. Específicamente, para los genes relacionados con enfermedades humanas, el

porcentaje de genes ortólogos en el pez cebra alcanza el 82% (Castillo-Salas, 2022., López-Domínguez, 2022., Vargas-Vargas, 2017). Además, los peces están estrechamente vinculados a su entorno acuático, ya que respiran, osmoregulan, mantienen el equilibrio ácido-base y regulan su temperatura en relación con el agua que los rodea, a su vez, sus adaptaciones estructurales y fisiológicas les permiten interactuar con compuestos xenobióticos presentes en su entorno (Castillo-Salas, 2022).

Entre otras ventajas se encuentra su patrón de desarrollo comparable al de los vertebrados superiores y la presencia de enzimas citocromo P450 y receptores nucleares similares a los mamíferos, su sensibilidad a diferentes compuestos químicos, aunado a que su mantenimiento en laboratorio es sencillo y económico. Su fertilización es externa y son muy prolíficos ya que una hembra puede producir alrededor de 200 óvulos por puesta, con un éxito de fecundación del 90%. Cuentan con un corion transparente y un patrón de desarrollo que facilita la observación y manipulación de embriones permitiendo observar los primeros estadios de desarrollo, facilitando el seguimiento de la expresión génica de interés mediante distintos marcajes sin necesidad de recurrir a técnicas invasivas, además de presentar transferencia materna de compuestos tóxicos a los ovocitos, lo que lleva a alteraciones en la expresión génica, haciéndolo aún más atractivo para estudios de genotoxicidad. Estos embriones tienen un desarrollo y crecimiento rápidos, con un tiempo de generación de aproximadamente 3-4 meses, y permanecen sexualmente activos la mayor parte de su vida, entre 4 y 5 años.

La toxicidad de varios contaminantes ha sido estudiada utilizando este modelo, demostrando que el pez cebra es útil para entender los efectos de estos sobre los órganos y para determinar la concentración letal media aguda (CL50). La capacidad del pez cebra para simular respuestas humanas a estos agentes tóxicos lo convierte en un modelo valioso para la investigación y desarrollo de tratamientos (Rahman-Khan y Sulaiman-Alhewairini, 2019). Actualmente ha sido ampliamente utilizado en estudios de toxicidad ambiental y calidad del agua, siendo pionero en experimentos de carcinogénesis. Estas investigaciones abarcan toxicocinética, toxicodinámica y toxicidad del desarrollo, analizando los efectos de los xenobióticos en órganos,

comportamiento e impacto en generaciones futuras (Ponce-Palomera *et al.*, 2023; Jaramillo-García, 2021).

Su uso se ha incrementado en el tamizaje toxicológico de compuestos químicos, desarrollo de medicamentos y estudios de neurotoxicidad, por lo cual, el uso del pez cebra en diversos estudios se encuentran en las guías de evaluación toxicológica de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), el Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). Esta última ha utilizado al pez cebra para realizar un barrido toxicológico de 306 sustancias químicas, incluidas las utilizadas como pesticidas y antimicrobianos (Noa-Rodríguez *et al.*, 2023).

Este pez también se ha empleado para desarrollar modelos de enfermedades utilizando técnicas de edición génica, como CRISPR/Cas9, ZFN o TALEN, que posibilitan realizar modificaciones genómicas precisas (Castillo-Salas, 2022; López-Domínguez, 2022; Espinosa-Cervates, 2020; Jaramillo-García, 2021).

Esta serie de ventajas pone al pez cebra como un excelente modelo biológico y un prototipo ideal para evaluar los efectos tóxicos derivados de la exposición ocupacional o ambiental a sustancias químicas como metales pesados. Aunado a que, los productos químicos pueden añadirse fácilmente al agua, a diferencia de los mamíferos, donde la administración se realiza mediante inyecciones, alimentos, ungüentos, etc. (Ponce-Palomera *et al.*, 2023; Jaramillo-García, 2021).

A pesar de ser una especie resistente a los cambios medioambientales, su uso en investigación ha requerido el establecimiento de condiciones básicas para su reproducción y mantenimiento. Para la crianza y reproducción se utilizan acuarios donde se recomienda mantener 5 ejemplares por litro de agua. El agua debe tener un pH de 6.8 a 7.5, una temperatura constante entre 23 y 30 °C. Además, se requiere un sistema de iluminación controlado para asegurar ciclos de luz y oscuridad (14 horas-10 horas). En cuanto a la alimentación, el pez cebra es omnívoro, y existen

preparaciones comerciales de alimentos que proporcionan una nutrición completa, la cual debe ser administrada una o dos veces al día (Vargas-Vargas, 2017).

1.4.2 Western Blot: técnica para la identificación de Metalotioneínas como biomarcadores de exposición

El Western blot, también conocido como “protein blotting” o “immunoblotting”, es una técnica introducida por Towbin y colaboradores en 1979, que consiste en la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), un detergente desnaturizante que provoca la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas causando que la migración de las proteínas en el gel dependa de su carga iónica y tamaño molecular, separándolas según su peso molecular. Luego se procede a su transferencia a una membrana absorbente de nitrocelulosa, PVDF (polyvinylidene difluoride) o nylon, donde las proteínas transferidas forman una copia exacta del gel original en el que fueron separadas por electroforesis, para la posterior detección inmunológica selectiva donde la membrana se incuba con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. El segundo anticuerpo está marcado con una enzima (como peroxidasa de rábano (HPR) o fosfatasa alcalina) que, en presencia de su sustrato, cataliza una reacción que produce una señal detectable en el sitio de acción de la enzima. Esta señal puede ser un precipitado coloreado o una emisión de luz (quimioluminiscencia), indicando la ubicación de la banda de proteína en la membrana. Así, se puede identificar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas.

Esta técnica se utiliza en biología molecular, bioquímica e inmunogenética para analizar mezclas complejas de proteínas, y se basa en la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno. Es útil para la identificación cualitativa o semicuantitativa de proteínas específicas y su peso molecular (Hnasko & Hnasko, 2015; Laskibar, s/a; Gómez-Camarillo, 2012).

Por esta razón, esta técnica se ha utilizado para la identificación de MT como biomarcadores de exposición a metales en diversos organismos. Un ejemplo de ello es el estudio de Chiodi-Boudet y colaboradores (2010), quienes analizaron la

inducción de MT en el camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus* expuesto a Cd mediante Western blot. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de esta proteína en los músculos, en función de la concentración de Cd.

Por su parte, Lorenzo-Gutiérrez (2020) estudió la MT1 en *Fusarium oxysporum* generando mutantes de Δ MT1 y la caracterizó en términos de tolerancia a metales y expresión génica, utilizando la técnica Western Blot para confirmar la localización subcelular de dicha proteína y cuantificarla en diferentes fracciones subcelulares. Se detectó que MT1 tiene una secuencia rica en cisteínas, contribuye a la tolerancia al Cd, Cu y Zn, y juega un rol clave en la homeostasis de Zn.

Esta técnica también se ha utilizado para evaluar el daño toxicológico causado por el agua residual textil vertida al Río Atoyac, Puebla, en el pez cebrá mediante cambios en la expresión de MT usando Western Blot. Los resultados mostraron que la expresión de MT es directamente proporcional a la cantidad de metal que ingresa al organismo (Estrada-Rivera, 2018).

Los marcadores de exposición a contaminantes ambientales son una herramienta útil en el monitoreo del impacto que producen los contaminantes en la salud humana y ecosistémica. Los seres vivos estamos expuestos a la acción de números compuestos potencialmente tóxicos que provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y en algunos casos genéticos, que deben ser monitoreados periódicamente en poblaciones ambiental u ocupacionalmente expuestas, para reducir el riesgo a padecer enfermedades crónico-degenerativas.

1.5 Metalotioneínas como biomarcadores de susceptibilidad en humanos

2. ANTECEDENTES

3. PLANTEAMIENTO

La actividad humana, a través de la minería, la industria, el transporte, la agricultura y la mala gestión de residuos, libera metales pesados en el aire, el agua y el suelo, contaminando ecosistemas enteros. Estos metales se bioacumulan en los organismos

y se concentran a lo largo de la cadena alimentaria, afectando la salud del ecosistema. Por esta razón, los seres vivos han desarrollado estrategias para eliminar metales de las células. En particular, poseen familias de MT capaces de secuestrar iones metálicos y transportarlos hacia los órganos de desintoxicación.

En México, se han realizado investigaciones sobre la contaminación por metales pesados en distintos ecosistemas; sin embargo, la información sobre la presencia de estos metales en los cuerpos de agua de los parques estatales es limitada. Por lo tanto, resulta fundamental dilucidar la presencia de metales en el agua de la Reserva Estatal Flor del Bosque, así como los mecanismos que los organismos presentes en estos ecosistemas emplean como medio de desintoxicación frente a dicha contaminación, como es el caso de la inducción de las MT. El parque cuenta con doce jagüeyes que brindan agua a los organismos que habitan la reserva, distribuidos en las tres secciones (forestal, recreativa y de conservación). Se desconoce el estado de conservación de estos cuerpos de agua y su impacto en los seres vivos.

Adicionalmente, se han observado cambios en la capacidad metabólica y en la eliminación de metales causados por variantes polimórficas en dichas enzimas en poblaciones humanas, como (MT1A rs8052394) las cuales se han asociado con un incremento en la tasa de bioacumulación de metales, cáncer, diabetes tipo II, síndrome metabólico y estrés oxidante, sin embargo aún no se conoce la frecuencia alélica de esta variante polimórfica en la población mexicana ni sus implicaciones en la salud de nuestra población. Recientemente, la SEMARNAT declaró emergencia ambiental en Tula de Allende y municipios cercanos debido a la grave contaminación por metales pesados y gases tóxicos por la alta concentración de industrias contaminantes que se concentran en la región, entre las que destacan las cementeras, la planta hidroeléctrica, la refinería Miguel Hidalgo, entre otras, es por ello que en la presente investigación nos proponemos analizar la presencia del alelo de riesgo de bioacumulación de metales rs8052394 en dicha población ocupacional y ambientalmente expuesta crónicamente a altas concentraciones de estos contaminantes.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

El riesgo a presentar daño genotóxico por metales puede ser consecuencia de la exposición crónica, así como de la susceptibilidad genética, lo que nos lleva a investigar biomarcadores de exposición y las variantes alélicas en MT1A, por lo que nuestras preguntas de investigación son:

- ¿La exposición ambiental aguda a altas concentraciones de metales como Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn aumenta la expresión de la proteína MT1 en hígado y branquia del pez cebra (*Danio rerio*)?
- ¿Cuál es la frecuencia del biomarcador de susceptibilidad genética (MT1A rs8052394) en población ambiental y ocupacionalmente expuesta a metales en los estados de Hidalgo y de México?

5. HIPÓTESIS

- La exposición a metales presentes en el agua de la Reserva Estatal Flor del Bosque aumentará la expresión de la proteína MT1 en hígado y branquia del pez cebra (*Danio rerio*), como mecanismo de defensa frente a la bioacumulación de metales.
- La presencia de la variante alélica MT1A rs8052394 en población humana expuesta ambiental y ocupacionalmente a metales podría ser responsable de la susceptibilidad genética a su bioacumulación.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar cambios en la expresión de MT1 en pez cebra (*Danio rerio*) como indicador de exposición a metales presentes en el agua de los jagüeyes de la Reserva Estatal Flor del Bosque, Puebla, así como la frecuencia del SNP rs8052394 en el gen humano MT1A en población mexicana.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la concentración de metales pesados (Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn) en el agua de tres de los doce jagüeyes de la Reserva Estatal Flor del Bosque, Puebla.

- Evaluar la expresión de la proteína MT1 en branquias e hígado del pez cebra (*Danio rerio*) tras exposición a agua de los jagüeyes de la REFB, para entender su rol en la desintoxicación de metales pesados.
- Determinar la frecuencia de la variante genética MT1A rs8052394 en población humana mexicana expuesta a metales en los estados de Hidalgo y de México, para identificar posibles asociaciones entre la susceptibilidad genética y la bioacumulación de metales.

8. METODOLOGÍA

8.1 Expresión de MT1 en *Danio rerio* expuestos a iones de metales pesados en el agua de la REFB.

8.1.1 Área de estudio:

La Reserva Estatal Flor del Bosque es un área natural protegida esencial y de preocupación para la Ciudad de Puebla (Imagen 9), principalmente debido a los niveles de contaminación detectados en su suelo, vegetación y especialmente en el agua de sus jagüeyes. Estos jagüeyes son vitales reservorios de agua dulce, necesarios para el equilibrio del ecosistema, pero en los últimos años se ha observado un deterioro en la calidad del agua que almacenan, lo que amenaza la biodiversidad local. En 2016, una investigación realizada por Mendoza y colaboradores reveló la presencia de metales tóxicos, como Hg, Pb, Cr, Cd y Cu en las especies vegetales y en el suelo de la reserva. Ese mismo año, otro estudio analizó el agua de cuatro jagüeyes de la reserva, encontrando huevos de helmintos, *Fasciola hepática* y niveles significativos de contaminación por coliformes fecales (180 UFC) y totales (475 UFC). Estos resultados representan un grave riesgo para la salud de las especies que consumen o viven en estas aguas, subrayando la necesidad de preservar y proteger esta área natural (Pérez-Osorio *et al.*, 2016).

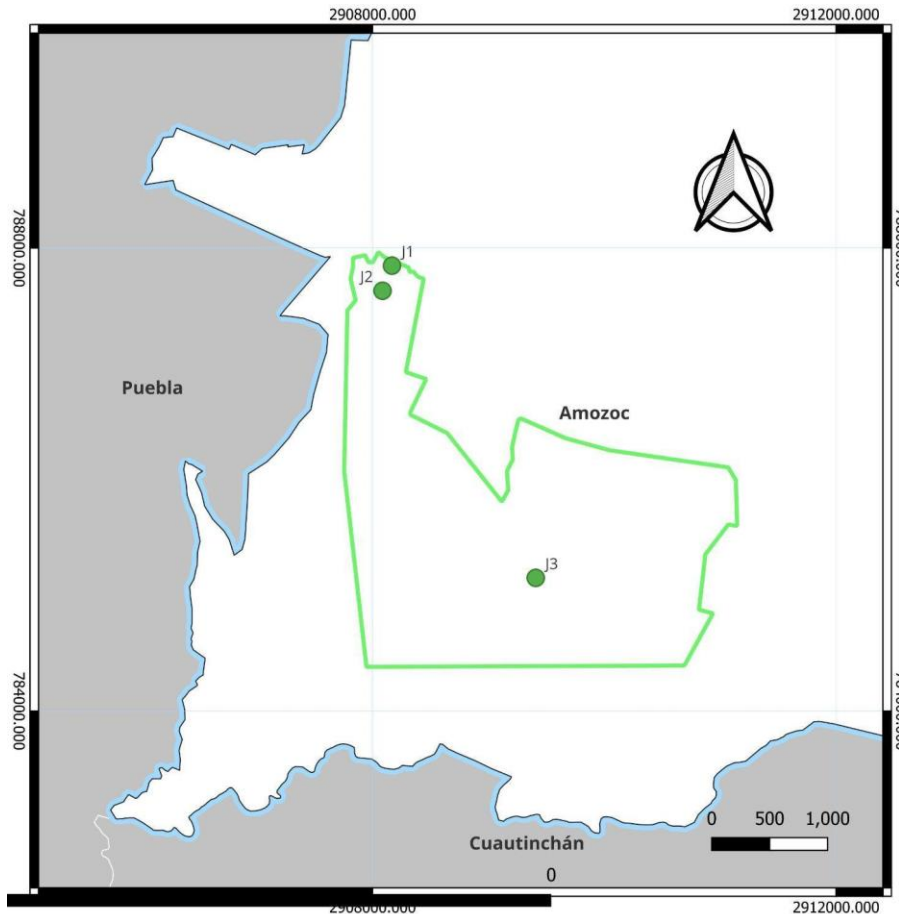


Imagen 9. Zona de estudio, Área Natural Protegida (ANP) Reserva Estatal Flor del Bosque, Puebla, México. Mapa generado con QGIS (Versión 3.16) elaborado por Piña-López, 2025.

Por lo que para la presente investigación se han elegido 3 jagüeyes por ser los más representativos del área de estudio (Imagen 9):

- Zona 1: Jagüey 1 “Desafíos” localizado en la zona recreativa de la Reserva Estatal Flor del Bosque, a una altitud de 2,228 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas 19°2’11” N y 98°6’46” O. El agua en esta área tiene un color café y un olor ligeramente desagradable (Imagen 10).
- Zona 2: Jagüey 2 “Vivero” localizado en el área de desarrollo forestal de la Reserva Estatal Flor del Bosque, a una altitud de 2,235 metros sobre el nivel

del mar, con coordenadas 19°2'4" N y 98°6'49" O. El agua presenta un color verde y se observa la presencia de vegetación acuática (Imagen 11).

- Zona 3: Jagüey 3 "Cabaña 6" localizado a un costado de la escuela de policía en la Reserva Estatal Flor del Bosque, a una altitud de 2,307 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas 19°0'42" N y 98°6'6" O. El agua presenta un color café y está acompañada de vegetación acuática (Imagen 12).



Imagen 10. Jagüey de la zona 1 "Desafíos" de la REFB al 20 de septiembre del 2023.



Imagen 11. Jagüey de la zona 2 "Vivero" de la REFB al 20 de septiembre del 2023.



Imagen 12. Jagüey de la zona 3 "Cabaña 6" de la REFB al 20 de septiembre del 2023.

8.1.2 Medición de metales pesados en el agua de los jagüeyes

Para la medición de metales pesados en los tres jagüeyes, se empleó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica. Esta metodología permitió la detección y cuantificación de elementos metálicos, garantizando la obtención de datos fiables sobre la concentración de metales pesados en las muestras. La espectrofotometría de absorción atómica, conocida por su alta sensibilidad y especificidad, resultó ser una herramienta adecuada para evaluar la contaminación de los jagüeyes y asegurar el cumplimiento de los estándares ambientales.

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica utilizada para detectar metales en diversas muestras como agua, suelo, aire, minerales, alimentos y productos químicos. El método se basa en la generación de átomos en estado elemental mediante una llama, horno de grafito, o reacciones químicas. Estos átomos absorben energía de una fuente de excitación del mismo elemento, y la cantidad de energía absorbida, medida contra una curva de calibración, es directamente proporcional a la concentración del metal en la muestra analizada.

Se solicitó dicha técnica porque el artículo 2.12 de la NOM 001 de la SEMARNAT exige su aplicación. Esta norma específica que se debe seguir la Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2016, que establece el método para la medición de metales pesados en aguas naturales, potables, residuales y tratadas mediante absorción atómica.

8.1.3 Bioensayo con *Danio rerio*

- 1. Acondicionamiento:** La fase de acondicionamiento de los peces tuvo como objetivo mantenerlos en condiciones ideales para su bienestar, asegurando parámetros de calidad del agua óptimos. Se seleccionaron 40 peces saludables, de edad y tamaño similares, sin importar su sexo, los cuales fueron distribuidos en cuatro acuarios de 30 litros, con 15 peces por acuario. Durante dos meses, los peces fueron acondicionados antes de los bioensayos, en acuarios equipados con los siguientes elementos:
 - a. Termostato (SUNNY 100W) para mantener la temperatura en $26^{\circ}\text{C} \pm 1$.
 - b. Lámpara LED (Ocean-Aqua Ocl-30W) para controlar el fotoperiodo de 12/12.
 - c. Dispensador automático de alimento para peces tropicales Chiye CY-059D) programado para dispensar Tetramin Tropical flakes tres veces al día.

Los cambios de agua se realizaban semanalmente, retirando residuos del fondo y reemplazando el agua con agua purificada, asegurando condiciones óptimas para los peces durante la aclimatación (Guía de 203 de la OCDE, 2023).

- 2. Bioensayo:** Los bioensayos se llevaron a cabo conforme a los lineamientos establecidos en la Guía 203 de la OCDE para evaluar la toxicidad en peces de agua dulce. DE

Se establecieron cuatro grupos: tres experimentales y un control. Cada grupo experimental consistió en un acuario con 10 peces. Los peces de los grupos experimentales fueron expuestos a 20L de agua de cada uno de los tres jagüeyes, mientras que el grupo control fue mantenido en agua purificada. Los bioensayos tuvieron una duración de 5 días (tratamiento agudo), durante los cuales todos los grupos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de fotoperiodo 12/12, temperatura y alimentación.

- 3. Disección:** Al finalizar el periodo de 5 días del tratamiento agudo, se procedió a la disección de los peces tanto de los grupos tratados como del grupo control. El sacrificio de los peces se realizó mediante un choque de temperatura, sumergiéndolos en agua fría (entre 0°C y 4°C), lo cual generó un enfriamiento progresivo y minimizó el sufrimiento, asegurando que la muerte fuera rápida (Carvajal, 2022 y AVMA, 2020).

4. Western

Blot

Para analizar los efectos tóxicos de los contaminantes acuáticos, se aplicó la técnica de Western Blot para examinar las proteínas a nivel molecular. Se extrajeron 10 pares de branquias y 10 hígados de cada grupo. Los órganos se conservaron en tubos Eppendorf a -50°C hasta ser procesados, garantizando la estabilidad de las proteínas y evitando su desnaturalización.

El análisis se basó en el protocolo de Abcam (2022), adaptado para identificar la sobreexpresión de MT1.

4.1 Preparación de la Muestra:

El primer paso consistió en la lisis celular, que se llevó a cabo añadiendo un buffer que incorporó un inhibidor de proteasas en forma de tableta (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Para extraer las proteínas (MT), se realizó una lisis mecánica en cada muestra, seguida de centrifugación, y el sobrenadante fue recuperado y transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril. Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante un ensayo de

Bradford. Finalmente, se ajustaron las concentraciones de las proteínas en todas las muestras para garantizar que todas las cargas tuvieran la misma concentración.

4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida:

Se añadió una solución de buffer de carga (Tris 1M pH 6.8, Glicerol 50%, SDS 10%, azul de bromofenol 1%, y β -mercaptoetanol 0.288 M), y luego se desnaturalizaron mediante ebullición durante 5 minutos. Después, se enfriaron hasta el momento de cargarlas en el gel de poliacrilamida.

Para la electroforesis, se utilizó un gel de poliacrilamida con una concentración de acrilamida al 12 %. El gel solidificado fue cargado con el marcador de peso molecular, seguido de las muestras del grupo control y los tratamientos. La electroforesis se realizó a 100 V durante 150 minutos (Plattner y Hentschel, 2014).

4.3 Transferencia

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m a amperaje constante (250 mA) usando un buffer de transferencia (1.44% glicina + 0.31% tris base) frío. En el proceso de transferencia, el gel es colocado en un casete de transferencia con membrana de nitrocelulosa, papeles filtro y esponjas, y luego se sometió a una transferencia húmeda a amperaje constante durante una hora, utilizando un buffer de transferencia Towbin. Se verificó la transferencia de las proteínas mediante tinción con rojo de Ponceau. Se lavó la tinción y se procedió a incubar con los anticuerpos (Primario Gene Tex Cat. No. GTX 12228, Metallothionein antibody clone name UC1MT, secundario IgG mouse anti Rabbit) (Plattner y Hentschel, 2014).

4.4 Revelado

Posteriormente, se realizó un bloqueo de la membrana para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, utilizando una solución de leche al 5% en TBS tween al 0.1 %. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario

específico para MT (UC1MT GeneTex Cat.No.GTX12228) durante la noche, seguida de una incubación con el anticuerpo secundario rabbit anti-mouse-HRP (YA370864, Invitrogen) 1:3000, y lavados con TBS-T. Finalmente, las proteínas fueron reveladas con el uso del Western Lightning Plus ECL reagent (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). las fotografías de los geles fueron tomadas en un fotodocumentador ChemiDoc™ MP imagen System (Bio-Rad Laboratories, Germany) y cuantificadas mediante el software de análisis de densitometría ImageJ, donde se ajustaron las imágenes digitalizadas para optimizar la visibilidad de las bandas y se calculó la intensidad de la señal para cada proteína, permitiendo la comparación entre las muestras de tratamiento y el control (Plattner y Hentschel, 2014).

8.1.4 Análisis estadístico

Para evaluar diferencias en las concentraciones de metales (Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn) en el agua de los tres jagüeyes analizados se realizaron histogramas en el programa OriginPro 2025.

Para estimar las diferencias en la inducción de MT1 en hígado y branquia de los peces expuestos al agua de los tres jagüeyes se realizó un histograma en el programa SigmaPlot.

Para evaluar la posible correlación entre la concentración de metales en el agua de los jagüeyes de la REFB y la inducción de MT1 en hígado y branquia se realizó un análisis de regresión lineal en el programa OriginPro 2025 y el análisis estadístico de los datos fueron mediante el programa SigmaPlot.

8.2 Genotipificación del polimorfismo de MT1A por PCR-RFLP

8.2.1 Área de estudio:

La región Atitalaquia-Tula-Apaxco los habitantes aledaños a esa zona la llaman región tolteca o valle del mexquital y la conforman los municipios de Atitalaquia, Atotonilco de Tula, Tula de Allende, Chilcuautla, Tezontepec de Aldama, Tepetitlán, Tlahuelilpan, Tlaxcoapan, Tepeji del Río de Ocampo, Mixquiahuala de Juárez, Progreso de Obregón y Tetepango de siendo 12 municipios del Estado de Hidalgo y

Apaxco, perteneciente al Estado de México, conformando un total de 13 municipios (De la Rosa, *et al.*, 2019).

Las zonas de muestreo fueron en cuatro municipios, tres del Estado de Hidalgo y uno en el Estado de México (Imagen 13) siendo:

- Atotonilco de Tula: El municipio de Atotonilco de Tula se encuentra al noroeste del estado de Hidalgo, con coordenadas centrales en 20° 00' 26" de latitud norte y 99° 13' 14" de longitud oeste, a una altitud promedio de 2,175 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Atitalaquia, al sur con Huehuetoca, al oeste con Tula de Allende y Tepeji del Río, y al este con el Estado de México.
- Atitalaquia: Atitalaquia está ubicado al sur de Hidalgo, entre las latitudes 20° 01' y 20° 06' norte, y las longitudes 99° 08' y 99° 18' oeste, con una altitud que varía entre los 2,000 y 2,700 metros sobre el nivel del mar. Colinda al norte con los municipios de Tlaxcoapan y Tetepango, al este con Ajacuba, al sur con Atotonilco de Tula y Tula de Allende, y al oeste con Tula de Allende y Tlaxcoapan. Este municipio representa el 0.30% de la superficie del estado y forma parte de la región geográfica del Valle del Mezquital.
- Tula de Allende: El municipio de Tula de Allende está situado al sur poniente de Hidalgo, entre las latitudes 19° 55' y 20° 11' norte, y las longitudes 99° 15' y 99° 32' oeste, a una altitud que oscila entre los 2,100 y 2,700 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Chapantongo, Tepetitlán y Tezontepec de Aldama; al este con Tezontepec de Aldama, Tlaxcoapan, Atitalaquia y Atotonilco de Tula; al sur con Tepeji del Río de Ocampo, y al oeste con el Estado de México. Tula de Allende tiene una superficie de 336.11 km², lo que representa el 1.61% de la superficie estatal. Además, es el municipio central de la zona metropolitana de Tula, que incluye a Atitalaquia, Atotonilco de Tula, Tlahuelilpan y Tlaxcoapan.
- Apaxco de Ocampo: El municipio de Apaxco se encuentra en el extremo sur del Valle de México, con coordenadas centrales de 19° 58' 11" de latitud norte y 99° 58' 11" de longitud oeste, a una altitud media de 2,200 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el estado de Hidalgo, al sur con Tequixquiac, al oeste con Hidalgo, y al este con Hueypoxtla y Tequixquiac.

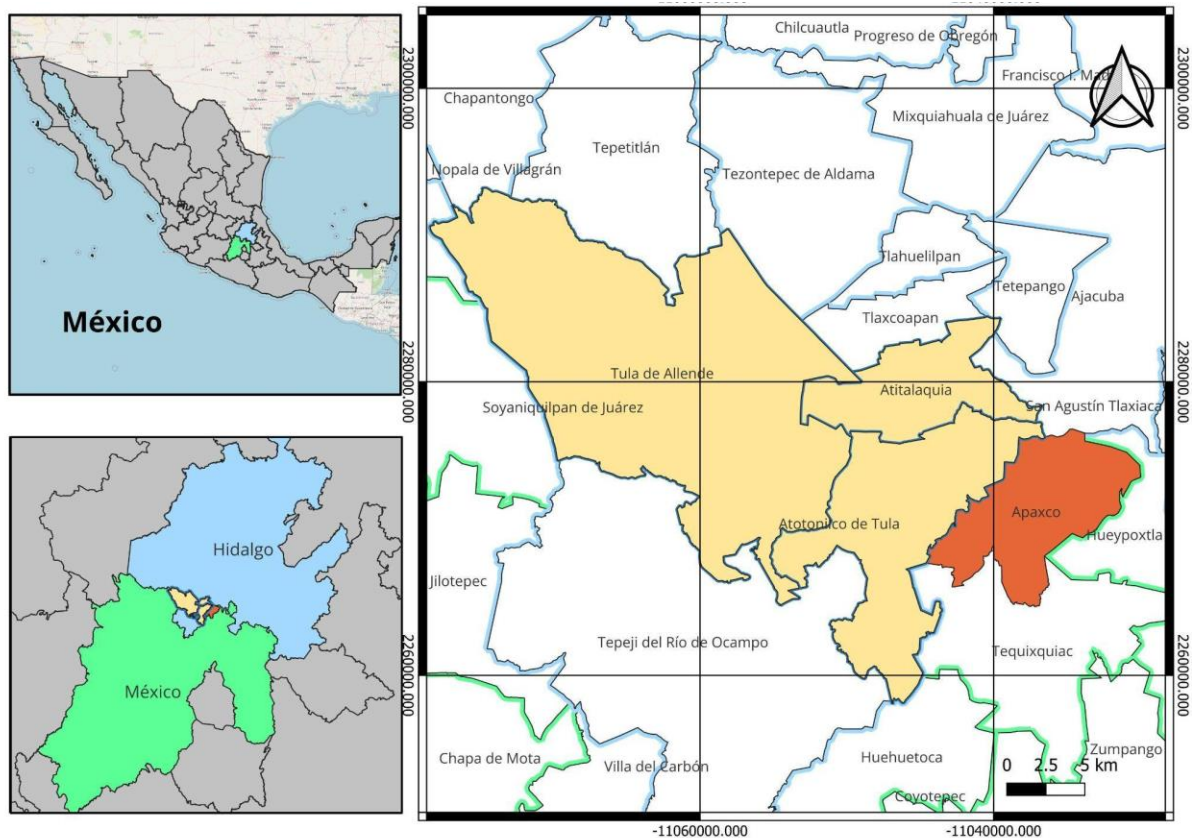


Imagen 13. Localización de los municipios de los estados de Hidalgo y México (Tula de Ocampo, Atitalaquila, Atotonilco de Tula, Apaxco) donde se realizó el muestreo poblacional para la genotipificación del polimorfismo MT1A. Fuente: QGIS Piña-López, 2025.

La selección de estos lugares se basó en varios criterios, entre los que destacan la alta concentración de industrias que contribuyen significativamente a la contaminación del agua, el aire y los suelos en la región ya considerada de emergencia sanitaria y ambiental, la presencia de organizaciones comunitarias dedicadas a la defensa de la salud y el medio ambiente, así como la alta densidad poblacional de algunos de estos municipios. Esta zona concentra una gran cantidad de unidades industriales, incluyendo cinco fábricas cementeras, una refinería, una planta termoeléctrica, la planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco (PTAR), cuatro caleras, así como otros sectores productivos e industriales, como la extracción intensiva de materiales no metálicos.

Por medio de la SEMARNAT se decretó emergencia ambiental a la región Tula de Allende en Hidalgo, y municipios aledaños, a causa de la grave contaminación en las diferentes matrices ambientales, lo que ha convertido en un territorio intolerable. Una de las principales razones es debido a que hay un sin fin de fuentes de contaminación

que se concentran en esa región tales como: la refinería Miguel Hidalgo (PEMEX), una termoeléctrica (CFE), diversas cementeras y caleras, planta tratadora de aguas, la presa Endhó de la cual recibe todas las aguas residuales de la ciudad de México, por lo que se encuentra en una situación altamente alarmante, debido a las altas concentraciones de Hg, As, Pb y Ba, entre otras diversas fuentes. Así como también se han registrado partículas de Ozono y Dióxido de Azufre. (Carrasco y Vargas, 2015).

8.2.2 Selección de la población

Se consideraron personas de ambos sexos que están expuestas a fuentes de contaminación por metales pesados (Tablas de la 2 a la 9).

Criterios de inclusión:

- Personas de 20 a 60 años que laboren o habiten como máximo a 5 km de distancia de las diversas fuentes de contaminación.
- Tiempo de residencia mayor a 2 años.
- De preferencia no fumadores.

Criterios de exclusión:

- Personas menores de 20 y mayores a 60 años que no laboren o habiten como máximo a 5 km de distancia de las diversas fuentes de contaminación.
- Personas con residencia menor a 2 años en el área.

Se solicitó a cada participante la firma de la carta de consentimiento, previa explicación del proyecto.

8.2.3 Obtención de las muestras biológicas

Se tomaron 5ml de sangre periférica por punción arterial, utilizando tubos Vacutainer™ con EDTA (Ref. 368171, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para la detección de polimorfismos. Las muestras se conservaron en hieleras a 4°C hasta su traslado y procesamiento en el Departamento de Biología y Toxicología del Instituto de Ciencias.

8.2.4 Medición de Pb en sangre

Con el propósito de identificar si los individuos de los cuatro municipios estaban expuestos a Pb, se cuantificó el Pb en sangre con ayuda de un equipo LeadCare II en el Centro de Genética y Ambiente (CIGyA) de la UATx mediante electroquímica (voltametría de separación anódica o ASV) y un sensor único para detectar Pb en sangre total. Este sistema posee un alto nivel de precisión para la detección de plomo en una población de alto riesgo y requiere un volumen muy pequeño de solo 50 uL de sangre para el análisis (OMS, 2013).

8.2.5 Purificación de ADN

El ADN se purificó a partir de una muestra de sangre periférica (5 ml), bajo el método de sales y perclorato de sodio. Se utilizó este método debido a la posibilidad de almacenar las muestras por un periodo de tiempo prolongado a una temperatura de -20°C.

Los núcleos celulares se aislaron agregando 35 ml de buffer de lisis (320mM sacarosa, 5mM MgCl₂, 1% Tritón X-100, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) a los 5 ml de sangre extraída. Se agitaron vigorosamente en un vortex y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 2ml de buffer de suspensión (150 mM NaCl, 60 mM EDTA, 1% de SDS, 400 mM Tris-HCl, pH 7.4) y 0.5 ml de perclorato de sodio (NaClO₄) 5M. Esta suspensión se mezcló por rotación 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 65° durante 30 minutos. Se agregaron 2 ml de cloroformo frío (a -20°C) y se mezcló nuevamente por rotación a temperatura ambiente durante 10 minutos seguido por centrifugación a 1400 g por 10 minutos.

La fase acuosa, que contiene al ADN, se transfirió a un tubo de 15 ml y se agregaron 2 volúmenes de etanol frío (a 4°C). El tubo se invirtió varias veces para precipitar el DNA y transferirlo a un tubo de 2 ml. El ADN se lavó 2 veces con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente al vacío para resuspender en 20 µL de buffer TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA pH 7.4), se incubó por 16 horas a 60°C, y se guardó a -20°C hasta usarse para la genotipificación de los alelos.

8.2.6 PCR-RFLP

La genotipificación se realizó mediante la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP). El SNP seleccionado para el estudio, rs8052394, ha sido asociado con un incremento en la acumulación de metales. Este polimorfismo fue analizado por Singh y colaboradores en 2020, donde se observó su relación con niveles elevados Pb, Cd y Zn en trabajadores expuestos. La amplificación del segmento polimórfico se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador Bio-Rad T100. Se emplearon los oligonucleótidos rs8052394 MT1A F: CAAACTGAGGCCAAGAGTGCACCA y MT1A R: TGACCTGAGGCAGGTGCCTGATTT para obtener un producto de PCR de 743 pb que fue sometido a restricción enzimática con la nucleasa *Pst*I (thermo scientific) el alelo silvestre (A) no presenta sitio de corte para la enzima, mientras que el alelo mutante (G) genera dos fragmentos, uno de (405 y otro de 338 pb) (Imagen 14). Las condiciones utilizadas para su amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de (95 °C por 1 min, 62 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos) y finalmente 72 °C por 5 minutos.

La restricción con la enzima *Pst*I se llevó a cabo en un termociclador de gradiente a una temperatura de 37 °C por 1 hora.

Los fragmentos de la digestión fueron separados por electroforesis, en gel de agarosa al 2% utilizando como referencia el marcador de peso molecular de 50 pb de ACCURIS, bajo un voltaje constante de 80 V, por 40 minutos, en la cámara electroforética Mini-Sub-Cell GT de BioRad. El gel fue teñido con el intercalante SmartGlow de ACCURIS y fue observado en el transiluminador UVP de Analytikjena, se tomaron fotografías para su posterior análisis.

8.2.7 Análisis estadístico

Para estimar la abundancia de enfermedades reportadas en las poblaciones encuestadas se realizó un histograma de frecuencia en el programa OriginPro 2025. Para comparar las concentraciones de Pb en sangre de los habitantes de los 4 municipios encuestados (Atitalaquia, Atotonilco, Apaxco y Tula de Allende) se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) en SigmaPlot.

Para comparar la frecuencia del alelo mutante (G) con las frecuencias reportadas en otras poblaciones se realizó una prueba Fisher, en la cual se consideró una diferencia

estadísticamente significativa entre las poblaciones cuando el valor de P fue menor a 0.05.

9 RESULTADOS

9.1 Análisis de la presencia de metales en el agua de los jagüeyes analizados de la REFB

Según los resultados obtenidos sobre los niveles de metales pesados en cada zona, se observó lo siguiente: el jagüey 2 presentó la mayor concentración de todos los metales analizados, superando los límites máximos permisibles establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021 para cada metal, así como los criterios ecológicos de calidad del agua (CE-CCA-001/89) destinados a la protección de la vida acuática en agua dulce para el Cr y el Hg. En cuanto a los jagüeyes 1 y 3, también se registraron valores por encima de dichos límites. En la zona 1, se superaron los límites de Cr, Ni, Pb, Hg y Zn; mientras que en la zona 3 se superaron los límites de Cd, Cr, Pb, Hg y Zn (Tabla 2, Gráficas de la 1 a la 7). Respecto al pH los 3 jagüeyes se mantuvieron en los límites establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021 y los CE-CCA-001/89 (Tabla 3).

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados encontrados en las distintas zonas de muestreo del área natural protegida parque “Flor del Bosque” el 20/09/23.

Característica	Resultado zona 1 (jagüey 1) mg/l	Resultado zona 2 (jagüey 2) mg/l	Resultado zona 3 (jagüey 3) mg/l	Límites máximos permisibles NOM-001-SEMARNAT-2021*	CE-CCA-001/89 de calidad para la protección de la vida de agua dulce**
Cadmio	0.11	0.21	0.16	0.15	-
Cobre	4	9	4.9	5	-
Cromo	0.95	1.5	0.78	0.75	0.01
Mercurio	0.006	0.01	0.006	0.008	0.0001

Níquel	4	8	2	3	-
Plomo	0.5	0.9	0.6	0.3	-
Zinc	17	28	17	15	-

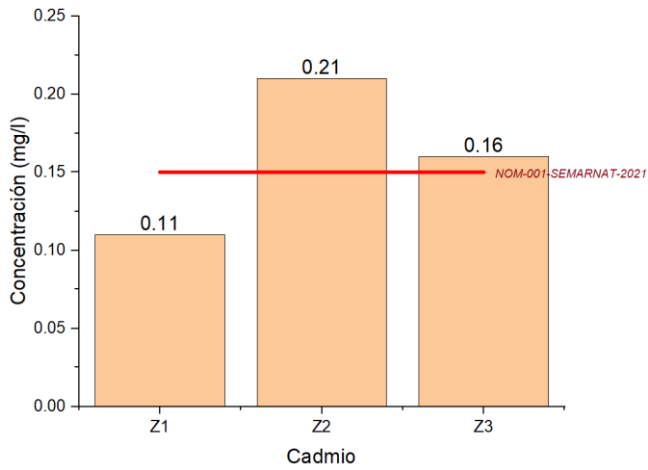
Fuente: Laboratorio de Análisis de Calidad del agua (Aquality) R. COFEPRIS: 202106518X0437. Los números en rojo indican valores por encima de los LMP según la NOM-001-SEMARNAT-2021, mientras que los números gruesos indican valores por encima de lo establecido según los CE-CCA-001/89 de calidad para la protección de la vida de agua dulce.

Tabla 3. pH del agua en los 3 jagüeyes analizados el 20/09/23 (Se tomaron muestras por triplicado de 3 zonas distintas de un mismo jagüey para obtener la media y desviación estándar.

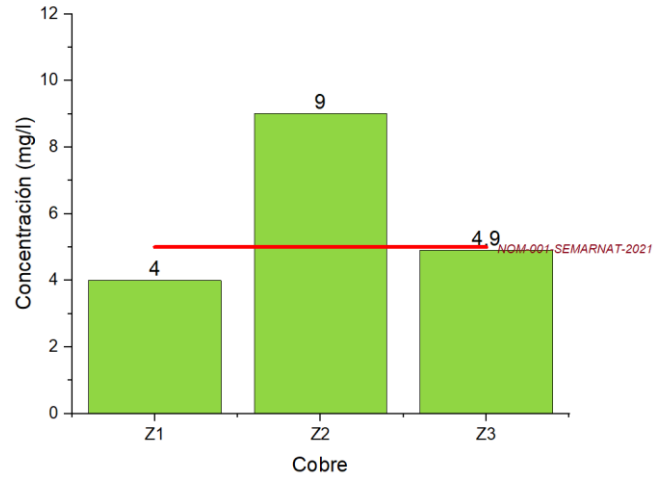
Parámetro	zona 1 (jagüey 1)	zona 2 (jagüey 2)	zona 3 (jagüey 2)	Límites máximos permisibles NOM-001- SEMARNAT- 2021*	CE-CCA-001/89 de calidad para la protección de la vida de agua dulce**
pH	7.41 ± 0.46	8.95 ± 0.12	7.17 ± 0.38	6 - 9	4.5 - 9

*De acuerdo con lo establecido en la NOM-001-SEMARNAT-2021, que indican los límites permisibles de contaminantes y potencial de hidrógeno en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación.

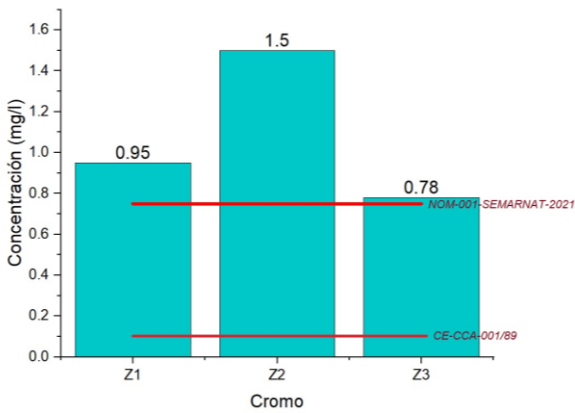
**Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89 para la protección de la vida de agua dulce: Grado de calidad del agua, requerido para mantener las interacciones e interrelaciones de los organismos, de acuerdo al equilibrio natural de los ecosistemas de agua dulce continental.



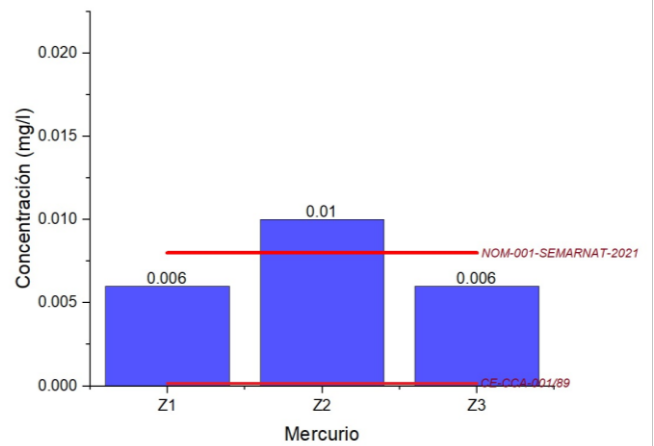
Gráfica 1. Niveles de Cd en las Zonas 1, 2 y 3. La línea roja representa el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 para dicho metal.



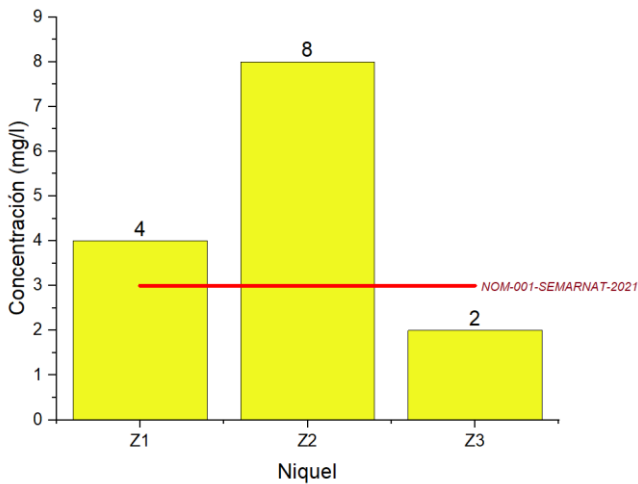
Gráfica 2. Niveles de Cu en las Zonas 1, 2 y 3. La línea roja representa el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 para dicho metal.



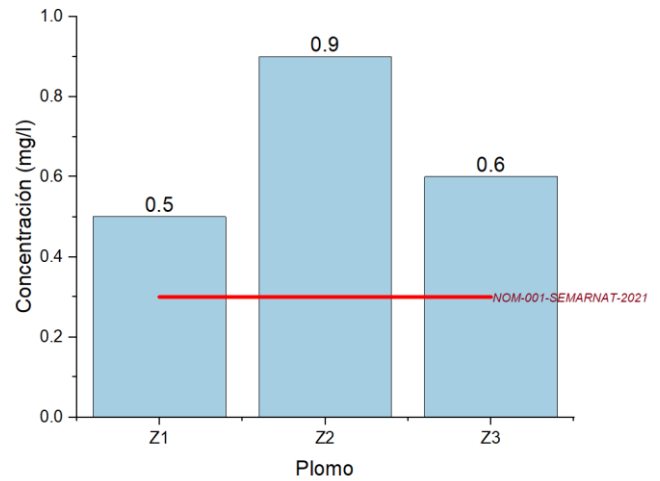
Gráfica 3. Niveles de Cr en las Zonas 1, 2 y 3. Las líneas rojas representan el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 y los establecidos según los CE-CCA-001/89 para dicho metal.



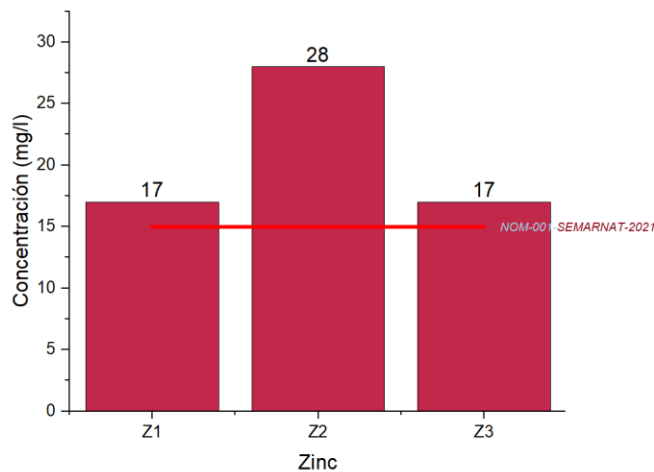
Gráfica 4. Niveles de Hg en las Zonas 1, 2 y 3. Las líneas rojas representan el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 y los establecidos según los CE-CCA-001/89 para dicho metal.



Gráfica 5. Niveles de Ni en las Zonas 1, 2 y 3. La línea roja representa el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 para dicho metal.



Gráfica 6. Niveles de Pb en las Zonas 1, 2 y 3. La línea roja representa el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 para dicho metal.

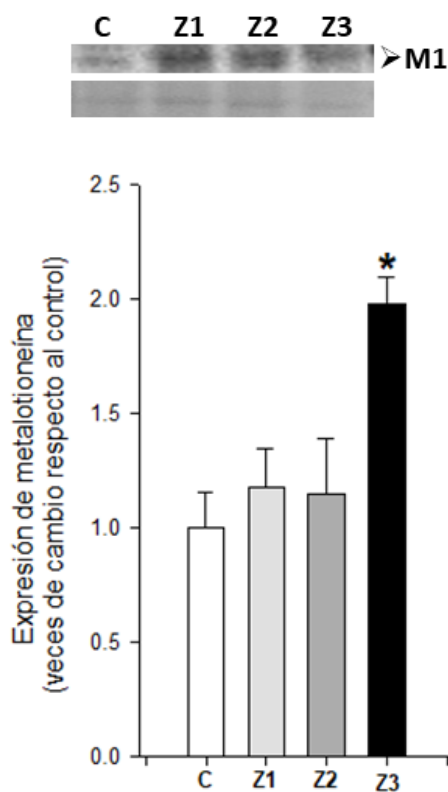


Gráfica 7. Niveles de Zn en las Zonas 1, 2 y 3. La línea roja representa el límite máximo permisible según NOM-001-SEMARNAT-2021 para dicho metal.

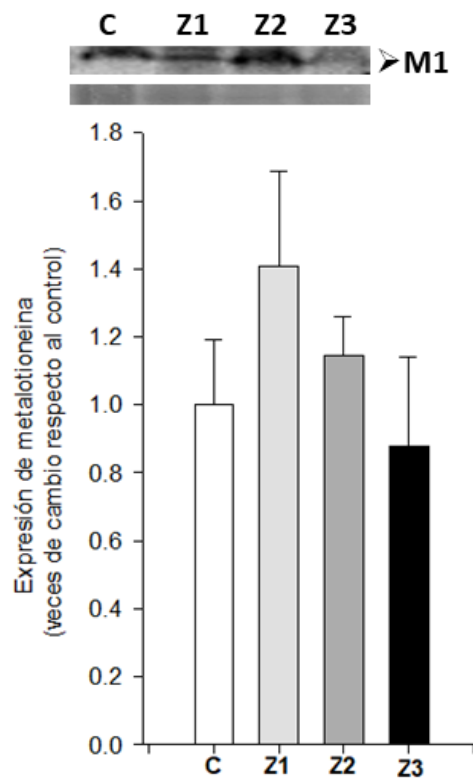
9.2 Western Blot para expresión de MT1 en hígado y branquia de *Danio rerio*.

El análisis de la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* mediante WB no mostró cambios estadísticamente significativos en los grupos experimentales con respecto al grupo control (Gráfica 9), a pesar de las concentraciones de metales por encima del límite máximo permisible según la NOM-001-SEMARNAT-2021 y de lo establecido en CE-CCA-001/89.

En el hígado, solo los peces expuestos al agua del jagüey 3 mostraron una mayor expresión de MT1 con respecto al grupo control, esto se debe a que dicho órgano es más sensible a los cambios en las concentraciones de metales al tratarse de un órgano especializado en la desintoxicación (Gráfica 8). Se esperaba que la mayor expresión de MT1 se observaría en los peces al jagüey 2, sin embargo, esto no fue así probablemente porque se superó la capacidad de desintoxicación debido a los excesivamente altos niveles de metales presentes en el agua de dicha zona.



Gráfica 8. Expresión de MT1 en hígado de pez cebra expuesto a contaminantes presentes en la zona 1, 2 y 3 de la Reserva Estatal Flor del Bosque al 20 de septiembre del 2023.

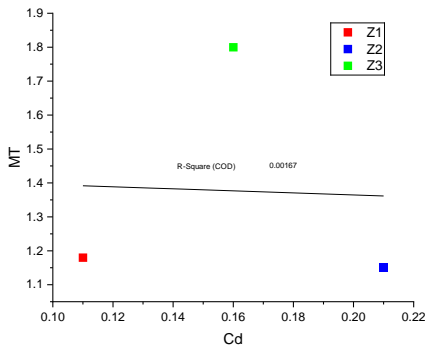


Gráfica 9. Expresión de MT1 en branquia de pez cebra expuesto a contaminantes presentes en la zona 1, 2 y 3 de la Reserva Estatal Flor del Bosque al 20 de septiembre del 2023.

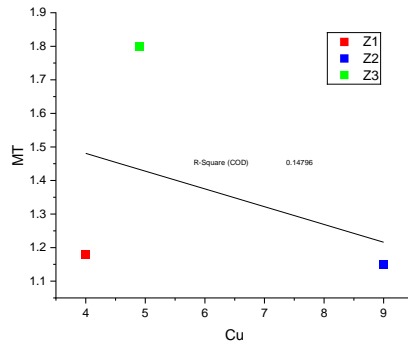
9.3 Correlación entre concentración de metales y expresión de MT1 en *Danio rerio*

Si bien nuestra investigación si reportó aumentos en la expresión de MT1 en hígado de pez cebra (*Danio rerio*) en los peces expuestos al agua del jagüey 3, no se encontró correlación entre la concentración de un metal y dicha expresión (Cd P=0.487, CU P=0.3743, Cr P=0.24, Hg P=0.3203, Ni P=0.2142, Pb P=0.3975, Zn

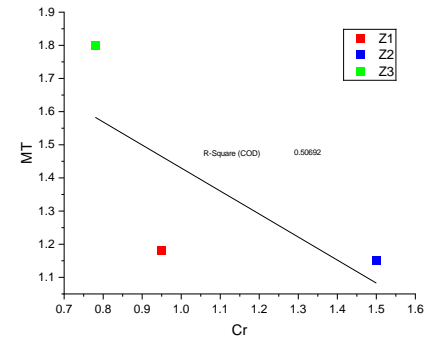
P=0.3203), esto puede deberse a diversos factores en la realización del experimento, como la edad de los individuos, el género, el peso, el estado de salud, el tamaño de la muestra y el tiempo de exposición (Gráficas de la 10 a la 23).



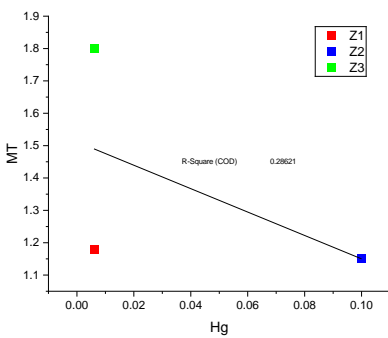
Gráfica 10. Correlación entre la exposición a Cd y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.487.**



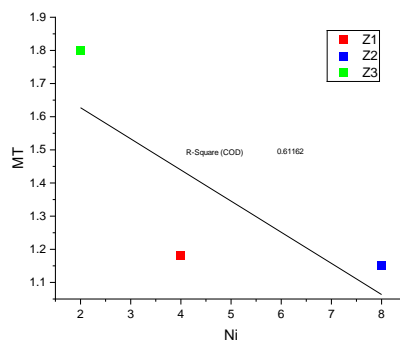
Gráfica 11. Correlación entre la exposición a Cu y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.3743.**



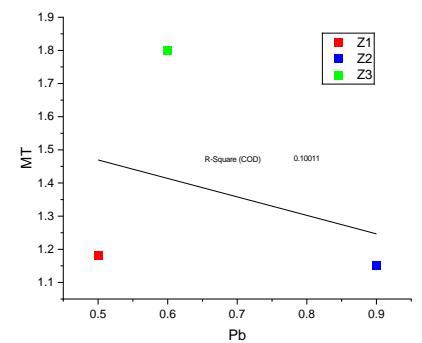
Gráfica 12. Correlación entre la exposición a Cr y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.24.**



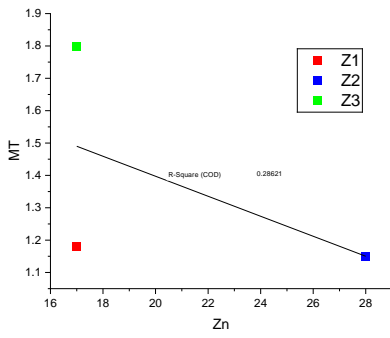
Gráfica 13. Correlación entre la exposición a Hg y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.3203.**



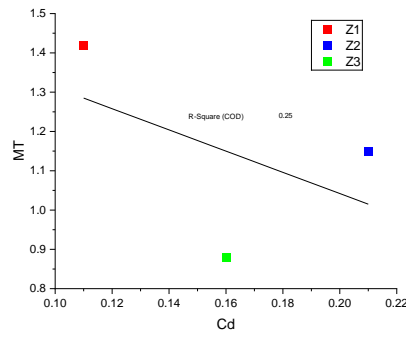
Gráfica 14. Correlación entre la exposición a Ni y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.2142.**



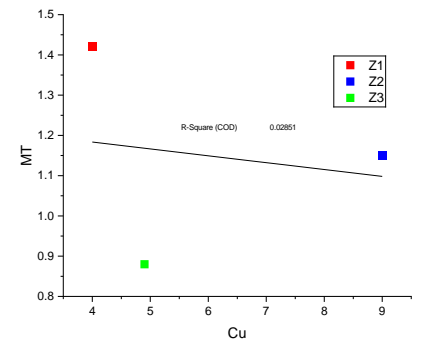
Gráfica 15. Correlación entre la exposición a Pb y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con **p=0.3975.**



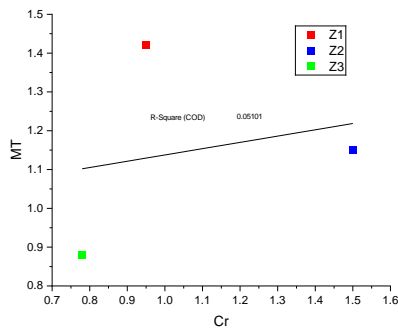
Gráfica 16. Correlación entre la exposición a Zn y la expresión de MT1 en hígado de *Danio rerio* con $p=0.3203$.



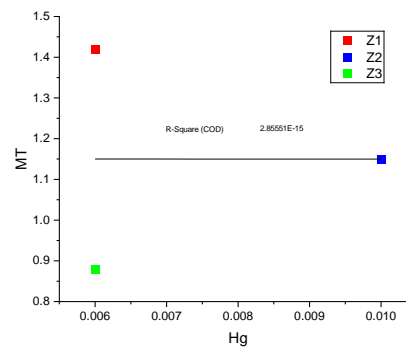
Gráfica 17. Correlación entre la exposición a Cd y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.3333$.



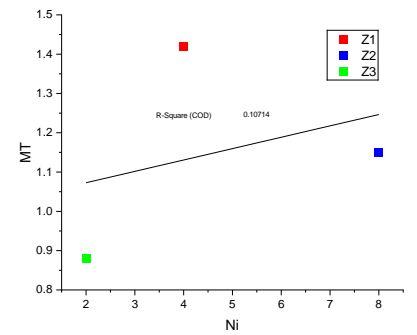
Gráfica 18. Correlación entre la exposición a Cu y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.446$.



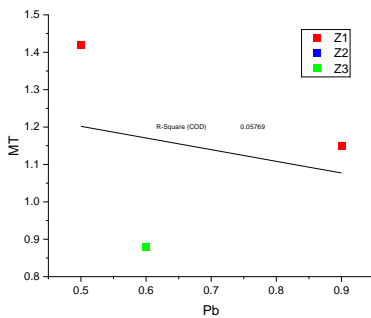
Gráfica 19. Correlación entre la exposición a Cr y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.4275$.



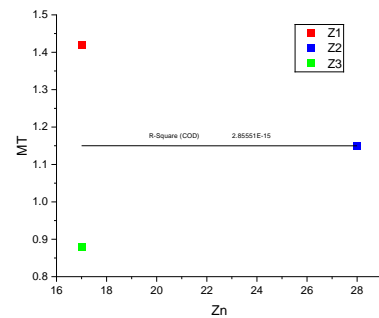
Gráfica 20. Correlación entre la exposición a Hg y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.5$.



Gráfica 21. Correlación entre la exposición a Ni y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.3939$.



Gráfica 22. Correlación entre la exposición a Pb y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.4228$.



Gráfica 23. Correlación entre la exposición a Zn y la expresión de MT1 en branquia de *Danio rerio* con $p=0.5$.

9.4 Datos demográficos de los habitantes encuestados de las zonas de estudio

Se realizó una encuesta a 58 habitantes de los distintos municipios analizados (Apaxco, Atotonilco, Atitalaquia y Tula) con el fin de conocer su edad, talla, tiempo de residencia, ocupación, consumo de medicamentos y se midió su nivel de Pb en sangre para ver si superaban los límites de Pb en sangre (5 µg/dL) señalados en la NOM-199-SSA1-2000 (Tabla 4-7). A su vez, se les preguntó acerca de las enfermedades que padecían ellos y familiares cercanos que residan también en la zona (gráfica 24-27).

Tabla 4. Datos demográficos y hábitos de la muestra poblacional del municipio de Apaxco, EdoMex.

No.	SEXO	EDAD	TALLA (m)	PESO (kg)	Años de residencia	Pb en sangre (µg/dL)	Consumo de medicamento los últimos 3 meses	Fuma	Ocupación	Tiempo que lleva laborando
AP1	M	36	1.7	71	30	4.6	Aspirina	No	Docencia y topógrafo	5-10 años
AP2	F	31	1.7	62	31	5.3	No	No	Oficina	1-3 años
AP3	M	35	1.73	75.5	35	<3.3	No	No	Docencia	1-3 años
AP4	M	35	1.7	83	5	6.2	No	No	Agente de ventas comercial	3-5 años
AP5	M	26	1.77	86.5	25	6.9	No	No	Mecánico	1-3 años
AP6	M	37	1.72	83.1	37	20.9	No	No	Mecánico y músico	5-10 años
AP7	M	36	1.69	71	36	3.3	Paracetamol	No	Eléctrico, plomero y soldador	>10 años
AP8	F	34	1.61	67.3	33	5.9	No	No	Home office	<1 año
AP9	F	35	1.71	69.2	33	3.5	No	No	Oficina	<1 año

AP10	F	26	1.66	84.3	19	4	Paracetamol	No	Ayuntamiento	<1 año
AP11	M	25	1.69	82.6	25	6.9	No	No	Ayuntamiento y reportero	<1 año
AP12	F	32	1.62	75.95	32	<3.3	Colágeno	No	Comerciante	1-3 años
AP13	F	34	1.58	62.9	18	<3.3	Antigripal	No	Home office	<1 año
AP14	F	31	1.56	55.7	25	<3.3	Ceftriaxona	Si	Gestión de campo	1-3 años

Los números en rojo rebasan los límites de Pb en sangre (5 µg/dL) señalados en la NOM-199-SSA1-2000 vigentes para la población no expuesta desde 2002 hasta la fecha.

Tabla 5. Datos demográficos y hábitos de la muestra poblacional del municipio de Atotonilco, Hidalgo.

No.	SEXO	EDAD	TALLA (m)	PESO (kg)	Años de residencia	Pb en sangre (µg/dL)	Consumo de medicamento los últimos 3 meses	Fuma	Ocupación	Tiempo que lleva laborando
AT15	F	35	1.6	55.5	8	<3.3	No	No	No	-
AT16	M	35	1.71	70	5	4.2	No	No	Docencia	3-5 años
AT17	M	32	1.78	102	32	<3.3	No	No	Refinería	5-10 años
AT18	F	36	1.66	86	36	5.8	Alopurinol	No	Ama de casa	-
AT19	M	30	1.75	83	30	7.1	No	No	Ingeniero de procesos (tratamiento de aguas)	1-3 años
AT20	F	48	1.52	72.75	20	<3.3	No	No	Fabrica, empacador de piedra y costura	3-5 años
AT21	F	37	1.64	60	18	4.5	No	No	Asistente de	1-3 años

									una agencia de carros	
AT22	M	30	1.76	87.15	30	15.7	No	No	Consultoría ambiental	<1 año
AT23	M	60	1.8	98	34	<3.3	Fenobarbital	No	Docente de preparatoria y plomero	>10 años
AT24	M	40	1.77	96.45	3	11.6	No	Si	Comerciante y entrenador deportivo	<1 año
AT25	M	40	1.7	70	40	17.2	No	No	Herrero	>10 años
AT26	M	31	1.78	72.95	31	3.5	No	No	Albañil y trabajo de campo	1-3 años
AT27	M	47	1.79	88.9	47	17.1	No	No	No	-
AT28	F	37	1.5	74	18	10.2	No	No	Administrativo y comerciante	>10 años
AT29	F	42	1.67	91	42	<3.3	No	No	Docente y ayuntamiento	5-10 años
AT30	M	53	1.8	103	53	<3.3	Loratadina	No	Administrativo de PEMEX	>10 años

Los números en rojo rebasan los límites de Pb en sangre (5 µg/dL) señalados en la NOM-199-SSA1-2000 vigentes para la población no expuesta desde 2002 hasta la fecha.

Tabla 6. Datos demográficos y hábitos de la muestra poblacional del municipio de Atitalaquia, Hidalgo.

No.	SEXO	EDAD	TALLA (m)	PESO (kg)	Años de residencia	Pb en sangre (µg/dL)	Consumo de medicamento los últimos 3 meses	Fuma	Ocupación	Tiempo que lleva laborando
A31	F	21	1.61	58	21	8.1	No	No	No	-

A32	M	24	1.76	87	24	20.5	No	Si	Panificadora	1-3 años
A33	M	27	1.79	58	25	<3.3	No	No	Imprenta y despacho jurídico	3-4 años
A34	F	26	1.62	56.5	26	6.7	Vitaminas B y E	No	No	-
A35	F	23	1.6	57	23	3.8	No	No	Consultoría	1-3 años
A36	M	27	1.81	82	23	7.8	No	Si	Refinería y minería de barita	3-4 años
A37	M	20	1.83	85	20	3.9	No	No	No	-
A38	M	19	1.7	75	19	4	Paracetamol	Si	No	-
A39	F	28	1.62	57	22	8.4	No	No	No	-
A40	F	19	1.57	66	19	4.9	Homeopáticos	No	Mesero	5-10 años
A41	M	21	1.52	57	21	8.2	Olanzapina y Fluoxetina	No	No	-
A42	M	33	1.7	82	33	12.4	No	No	Carpintero	5-10 años
A43	M	32	1.71	71	4	17	Complejo B y ácido fólico	No	No	-
A44	M	22	1.71	89.9	22	4	No	No	No	-

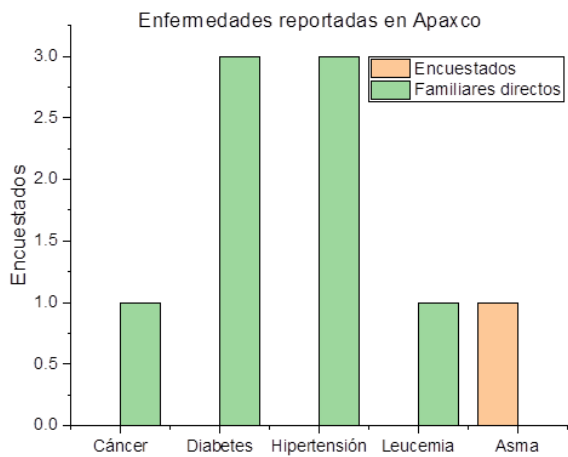
Los números en rojo rebasan los límites de Pb en sangre (5 µg/dL) señalados en la NOM-199-SSA1-2000 vigentes para la población no expuesta desde 2002 hasta la fecha.

Tabla 7. Datos demográficos y hábitos de la muestra poblacional del municipio de Tula, Hidalgo.

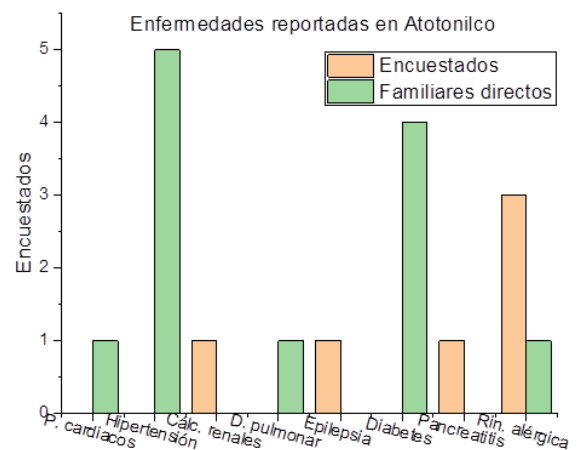
No.	SEXO	EDAD	TALL A (m)	PESO (kg)	Años de residencia	Pb en sangre (µg/dL)	Consumo de medicamento los últimos 3 meses	Fuma	Ocupación	Tiempo que lleva laborando
-----	------	------	------------	-----------	--------------------	----------------------	--	------	-----------	----------------------------

T45	M	33	1.71	75.2	33	<3.3	Salbutamol	No	Analista de contenido de medios audiovisuales y docente	<1 año
T46	M	21	1.83	110	21	<3.3	Metformina	No	No	-
T47	F	49	1.5	66	49	<3.3	No	No	Secretaria	>10 años
T48	M	35	1.64	73	3	3.9	Paracetamol	Si	Ayudante general en cementera	3-5 años
T49	M	32	1.64	62	32	<3.3	No	No	Ama de casa	5-10 años
T50	M	25	1.76	56	25	<3.3	Neokap-LF	No	Obrero de cementera	3- 5 años
T51	M	35	1.65	84	4	5	No	Si	Obrero de cementera y electricista	5-10 años
T52	M	26	1.76	90	1.5	<3.3	No	Si	Obrero	1- 3 años
T53	M	36	1.84	77	5	17.9	Antibióticos, analgesico, antiinflamatorio	No	No	-
T54	M	26	1.73	77	26	3.4	No	No	Obrero de cementera	3-5 años
T55	M	42	1.64	63	35	6.6	Stresstab	No	No	-
T56	M	39	1.76	98	20	<3.3	No	No	Abogada, Litigante y operador de gym	5-10 años
T57	M	33	1.73	83	33	4.3	Bedoyecta	No	Mantenimiento Refinería	5-10 años
T58	F	25	1.64	61	25	6	No	No	No	-

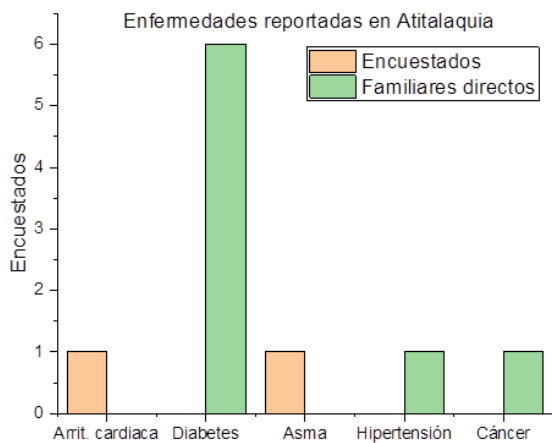
Los números en rojo rebasan los límites de Pb en sangre (5 µg/dL) señalados en la NOM-199-SSA1-2000 vigentes para la población no expuesta desde 2002 hasta la fecha.



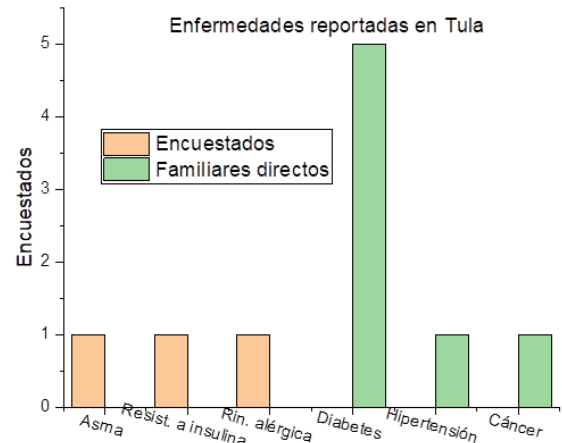
Gráfica 24. Enfermedades personales y familiares reportadas en la muestra poblacional del municipio de Apaxco.



Gráfica 25. Enfermedades personales y familiares reportadas en la muestra poblacional del municipio de Atotonilco.



Gráfica 26. Enfermedades personales y familiares reportadas en la muestra poblacional del municipio de Atitalaquia.



Gráfica 27. Enfermedades personales y familiares reportadas en la muestra poblacional del municipio de Tula.

9.5 Análisis comparativo de niveles de Pb en sangre en individuos de 4 localidades mexicanas

Se realizó una prueba ANOVA para observar si existía diferencia en el contenido de Pb en sangre en los individuos de los cuatro municipios, no se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre los habitantes de los cuatro municipios analizados (Apaxco vs. Atotonilco P=0.82, Apaxco vs. Atitalaquia P=0.5848, Apaxco vs. Tula P=0.9766, Atotonilco vs. Atitalaquia P=0.9708, Atotonilco vs. Tula P=0.5711, Atitalaquia vs. Tula P=0.3436) (Tabla 8).

Tabla 8. ANOVA del análisis comparativo de las concentraciones de Pb en sangre entre los municipios Apaxco, Atotonilco, Atitalaquia y Tula.

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95,00% IC de dif.	Valor P ajustado
Apaxco vs. Atotonilco	-1.529	-6.187 to 3.128	0.82
Apaxco vs. Atitalaquia	-2.307	-7.117 to 2.503	0.5848
Apaxco vs. Tula	7.429	-4.067 to 5.553	0.9766
Atotonilco vs. Atitalaquia	-7.777	-5.435 to 3.880	0.9708
Atotonilco vs. Tula	2.272	-2.385 to 6.930	0.5711
Atitalaquia vs. Tula	03.05	-1.760 to 7.860	0.3436

9.6 PCR-RFLP *in silico* del sitio polimórfico del gen MT1A humano

En el alineamiento de primers se delimitó un fragmento de 743 pb, la endonucleasa *PstI* reconoce la secuencia 5'-CTGCA/G-3' generando dos fragmentos (405 y 338 pb) con extremos cohesivos 3' (Tabla 12).

Tgacctgaggcaggtgcctgatttgccttaaggcactcagtgtgtaagataataggacaaggctccagcaccca
 ggtctctggactctcaatgcaatccacatcccagctctgttgggtatgggtcccttattccaaggcacacaaagaa
 aaccagagccagcattaagtgcgaacttttattatcattcacatatttcattaaaaaaaatacagtaaagggtcaggg
 ttgtatggaaaaaaattccaagttgtgcaggtcactcttctatacttcgagcagggctgtccggacatcaggcaca
 gcagctgcacttctctgatgcccttgcagatgcagccctgggcacacttggcacagctcatggggcagcaggagc
 agcagcctggggaagaaggagagtgagaggtcagaccagacttgaccggggacttccctgccccagagaag
 cctggcccaagctctgtcccagcccagaggacacttagttcaggatggcatgcactgtcggagatgggagataa
 gtggtggatcttctgagtgagggtcttctgtgaaaagcttatctccatctgagccccagacctggcagaaggctggaaa
 ggcagtgactggggttatgaaggacaaaggaaggctggctcccagaaccacacacttaggggaggaaagtcctt
 aggtgtcatgtctgtgcttggcaggct**gggtgcactcttggcctcagttt**

9.7 Prevalencia de la variante rs8052394 (A 152 G) en MT1A por PCR-RFLP en población mexicana

La identificación del alelo mutante G se obtuvo mediante la generación del sitio de restricción de la enzima *Pst*I. El alelo silvestre (A) no presenta sitio de corte para la enzima, por lo que en homocigotos se observa una única banda de 743 pb. El alelo mutante (G) sí presenta sitio de corte, generando dos bandas de 405 pb y 338 pb en homocigotos. En heterocigotos (A/G) se observan tres bandas: 743, 405 y 338 pb (Imagen 14).

El análisis de PCR-RFLP (Imagen 15) nos mostró una frecuencia del alelo silvestre A de 0.67 mientras que del alelo mutante G de 0.33, la frecuencia del alelo mutante observada en esta investigación es una de las más altas reportadas únicamente superada por la frecuencia reportada en población colombiana (Tabla 14).

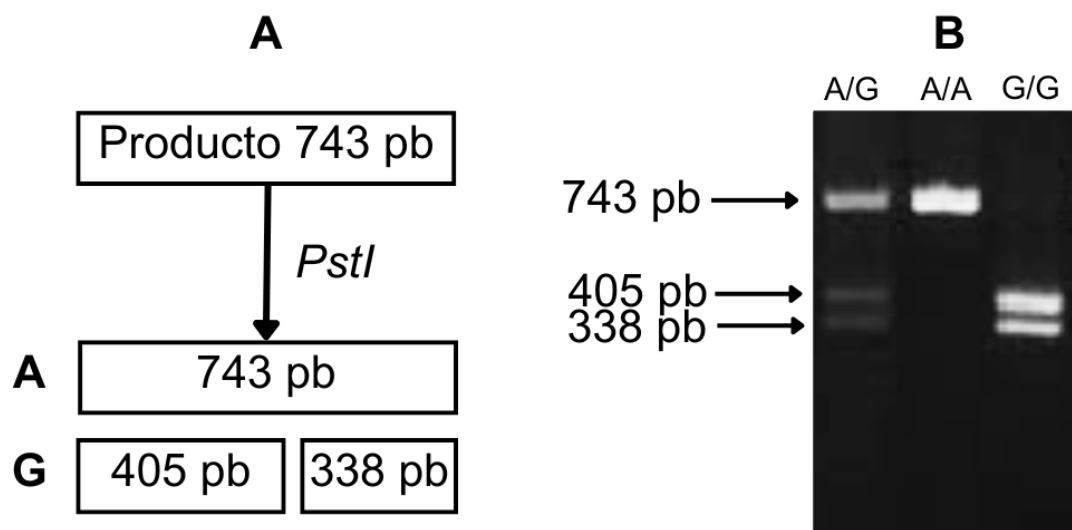


Imagen 14. Determinación del polimorfismo rs8052394 mediante el ensayo PCR-RFLP. A) Producto de amplificación por PCR de 743 pb (amplicón) digerido con la enzima *Pst*I para identificar los alelos A152>G mediante patrones de restricción. B) Genotipificación de alelo silvestre (A) y mutante (G). Fuente: Modificado de Singh, *et al.*, 2020.

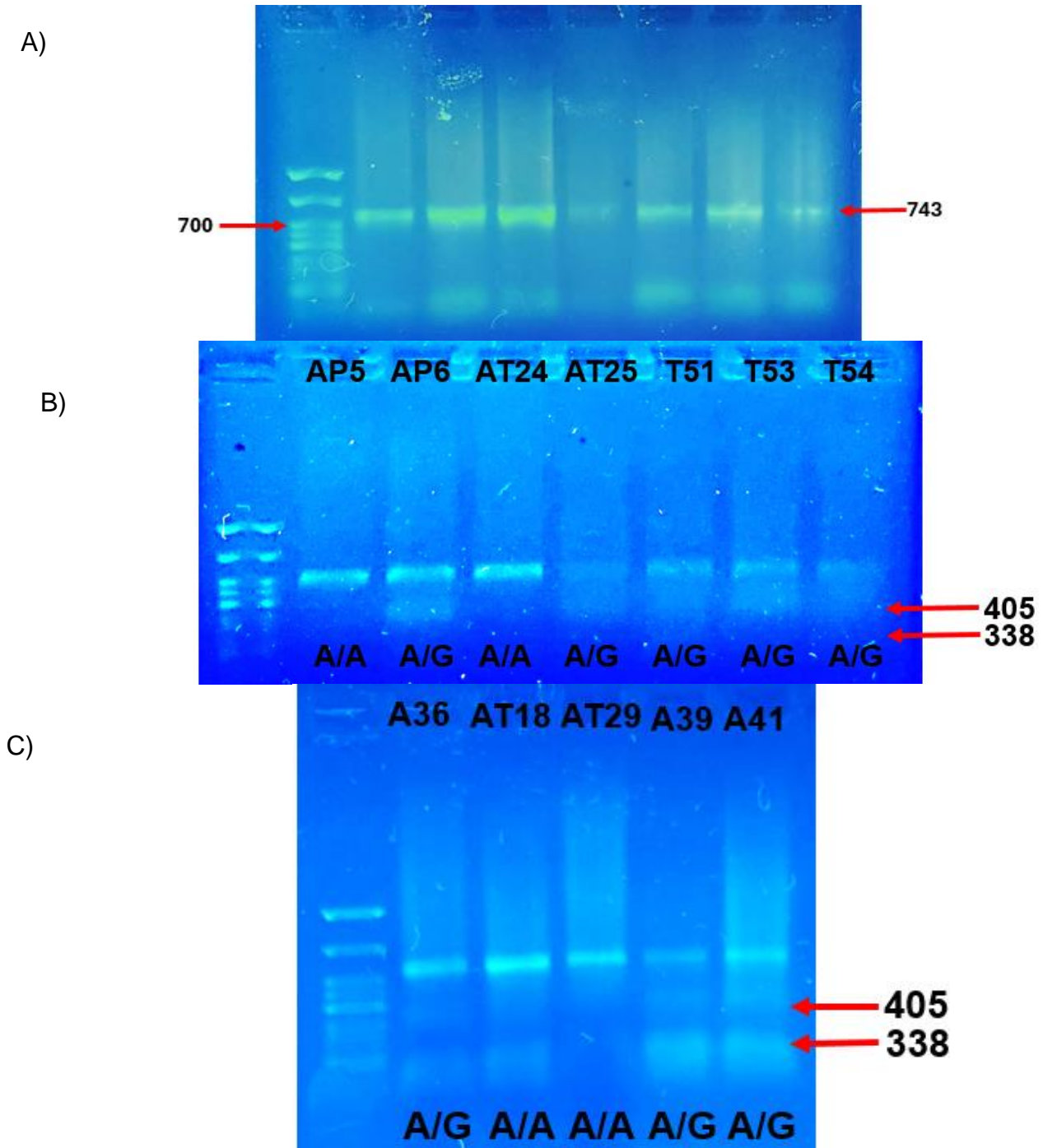


Imagen 15. A) Producto de PCR de 743 pb. B y C) RFLP, producto de PCR 743pb, producto de restricción enzimática con *Pst*I. Alelo A no presenta sitio de corte para la enzima, Alelo G genera dos fragmentos (405 y 338 pb). La muestra AP5, AT24, AT18 y AT19 presentan un genotipo homocigoto silvestre (A/A), mientras que las muestras AT25, T51, T53, T54, A36, A39 y A41 tienen un genotipo heterocigoto mutante (A/G).

La frecuencia de los genotipos de MT1A entre los individuos estudiados fue la siguiente: 33% de tipo silvestre (A/A: 1 banda de 743 pb), 67% heterocigoto (A/G: tres bandas de 743, 405 y 338 pb) y 0,0% homocigoto (G/G: dos bandas de 405 y 338 pb); 66% alelo A y 33% alelo G (Tabla 9). La distribución de la frecuencia del genotipo se ha estudiado en poblaciones alrededor del mundo encontrando asociaciones con diversos padecimientos dependiendo el genotipo.

La frecuencia del alelo mutante G en MT1A observada en la población mexicana analizada, fue estadísticamente diferente a las reportadas en India ($p=0.0013$), Irán ($p=0.0006$), Estados Unidos ($p=0.0001$), la Unión Europea ($p=0.0006$), Italia ($p=0.0006$) y España ($p=0.0025$), pero tuvo relación con la reportada en Colombia ($p=0.2425$), China ($p=0.5392$) y Nepal ($p=0.0792$) (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencia del polimorfismo rs8052394 del gen de la MT1A en diversas poblaciones:

País	N	Frecuencia de genotipo			Frecuencia de alelo		Cita	Valor-P*
		AA	AG	GG	A	G		
México (Hidalgo y Estado de México)	12	0.334(4)	0.666(8)	0(0)	0.667(16)	0.333(8)	Este estudio.	-
Colombia	350	0.34(119)	0.488(171)	0.172(60)	0.584(290)	0.416(231)	Aguilar-Méndez., 2021.	0.2425
China	293	0.529(155)	0.3891(114)	0.0819(24)	0.7235(424)	0.2765(162)	Wong, <i>et al.</i> , 2013.	0.5392
India	100	0.78(78)	0.19(19)	0.03(3)	0.875(175)	0.125(25)	Sing, <i>et al.</i> , 2020.	0.0013
Irán	300	0.76(228)	0.24(72)	0(0)	0.88(528)	0.12(72)	Rahman, <i>et al.</i> , 2022.	0.0006
Nepal	82	0.609(50)	0.355(29)	0.036(3)	0.786(64)	0.214(18)	Khatiwada,	0.0792

							<i>et al.</i> , 2016.	
Estados Unidos	137	0.825(113)	0.161(22)	0.014(2)	0.9051(248)	0.0949(26)	Wang, (2011).	0.0001
Unión Europea (Italia, Grecia, Polonia, Francia y Alemania)	110	0.764(84)	0.227(25)	0.009(1)	0.88(194)	0.12(26)	Giacconi, <i>et al.</i> , 2014.	0.0006
Italia	694	77.0(534)	21.6(150)	1.4(10)	0.8775(1218)	0.1225(170)	Cipriano, <i>et al.</i> , (2006).	0.0006
España	4552	0.735(3346)	0.243(1106)	0.022(100)	0.8565(7798)	0.1435(1306)	NCBI. (2016).	0.0025

*El valor de P obtenido mediante la prueba Fisher muestra si la frecuencia en población mexicana es distinta a la reportada en otras poblaciones, para verificar si la diferencia fue estadísticamente significativa entre las poblaciones analizadas, se utilizó en todas las comparaciones el nivel significativo del 5% ($P < 0.05$).

10. DISCUSIÓN

10. 1 Concentraciones de metales pesados en los jagüeyes de la REFB

El muestreo para identificación de metales en el agua de la presente investigación se realizó en septiembre del 2023, en el jagüey 2 (vivero) se observó la mayor concentración de metales, seguido por concentraciones semejantes de metales en los jagüeyes 1(Desafíos) y 3 (Cabaña 6) (Tabla 2).

- En el caso del Cd, en el jagüey 1, se registró una concentración de 0.11 mg/l, en el jagüey 2: 0.21 mg/l, y en el jagüey 3: 0.16 mg/l. En estos dos últimos, los valores están por encima del LMP de 0.15 mg/l según la NOM-001-SEMARNAT-2021. El Cd es un metal altamente tóxico, especialmente para la fauna acuática.

- Para el Cu, los resultados fueron de 4 mg/l en el jagüey 1, 9 mg/l en el jagüey 2, y 4.9 mg/l en el jagüey 3. Solo el jagüey 2 superó los LMP de 5mg/l que establece la NOM-001-SEMARNAT-2021. El Cu, aunque esencial en bajos niveles para ciertos organismos acuáticos, puede ser tóxico en concentraciones elevadas.
- Para el Cr, los resultados muestran concentraciones de 0.95 mg/l en el jagüey 1, 1.5 mg/l en el jagüey 2 y 0.78 mg/l en el jagüey 3. Todos estos valores exceden el LMP de 0.75 mg/l según la NOM-001-SEMARNAT-2021 y el de 0.01 según los CE-CCA-001/89. En el jagüey 2 la concentración duplica el valor del LMP, lo que indica un riesgo ambiental más serio en esta zona. El Cr es un metal pesado que, en su forma hexavalente, es altamente tóxico y puede inducir cáncer de piel.
- En cuanto al Hg, los valores encontrados fueron de 0.006 mg/l en el jagüey 1, 0.01 mg/l en el jagüey 2 y 0.006 mg/l en el jagüey 3. La concentración de este metal solo supera los LMP de la NOM-001-SEMARNAT-2021 de 0.008 mg/l en el jagüey 2, sin embargo, la concentración de dicho metal en los tres jagüeyes si supera el LMP de 0.0001 mg/l según los CE-CCA-001/89, lo que indica un riesgo ecológico en todas las zonas. Esto es preocupante, ya que este metal tiene efectos acumulativos a largo plazo en los ecosistemas acuáticos. El Hg es un contaminante persistente que puede tener efectos devastadores en los organismos acuáticos y en la cadena alimentaria.
- Los resultados de Ni fueron 4 mg/l en el jagüey 1, 8 mg/l en el jagüey 2 y 2 mg/l en el jagüey 3. En el jagüey 1 y 2 estas concentraciones son superiores al LMP según la NOM-001-SEMARNAT-2021 de 3 mg/l. El Ni puede causar reacciones alérgicas, trastornos respiratorios y cáncer.
- Para el Pb, los resultados fueron 0.5 mg/l en el jagüey 1, 0.9 mg/l en el jagüey 2 y 0.6 mg/l en el jagüey 3. Los tres jagüeyes exceden el LMP de 0.3 mg/l según la NOM-001-SEMARNAT-2021, lo que señala que las tres zonas presentan niveles peligrosos de dicho metal, especialmente el 2, donde el valor triplica el LMP. El Pb afecta el crecimiento y desarrollo de los organismos acuáticos.
- En cuanto al Zn, sus concentraciones fueron de 17 mg/l en el jagüey 1, 28 mg/l en el jagüey 2 y 17 mg/l en el jagüey 3. En los tres jagüeyes se supera el LMP de 15 mg/l según la NOM-001-SEMARNAT-2021. El Zn es un elemento

esencial en los seres vivos que en concentraciones moderadas no representa un riesgo, pero en niveles elevados puede ser tóxico sobre todo en la piel.

Chan *et al.* (2006) determinaron los valores de CL₅₀ (concentración letal media aguda) expuestos a varios iones metálicos, encontrando que los embrión-larvas de pez cebra (8hpf) eran especialmente sensibles a Cu²⁺ y Hg²⁺, con valores de CL₅₀ de 5.16 y 10.43 μM respectivamente, pero mostraron cierta resistencia a Zn²⁺ con una CL₅₀ de hasta 6112 μM, seguido del Cd²⁺ con un valor de CL₅₀ de 214.5 μM.

La calidad del agua de los jagüeyes puede verse considerablemente afectada por la deposición de contaminantes atmosféricos, provenientes de las zonas urbanas e industriales aledañas, así como de los vehículos que circulan por las avenidas que rodean la REFB. Los metales pesados presentes en la atmósfera pueden precipitarse con la lluvia, incrementando la contaminación de aguas superficiales. En México, septiembre es uno de los meses más lluviosos, especialmente en las regiones sur y centro (donde se realizó el estudio), debido a que forma parte de la temporada de lluvias, que va de mayo a octubre. Durante este mes, las precipitaciones son más frecuentes, en gran parte por la influencia de fenómenos climáticos como los ciclones tropicales.

Entre las principales fuentes de contaminación de la REFB se encuentran las emisiones generadas por las actividades económicas en los parques industriales en el municipio de Amozoc, tales como la industria metalúrgica, química, de construcción, minería, así como las actividades de alfarería. Otra fuente de contaminación son los vehículos de combustión interna que circulan por el periférico ecológico y la carretera federal a Tehuacán, vialidades que colindan con el parque; adicionalmente se ha reportado la caída de ceniza proveniente del volcán activo Popocatepetl (Narvaéz-Porras & Cano-Valle, 2004).

10.2 Expresión de MT1 en *Danio rerio*

De los órganos analizados, únicamente el hígado de los peces expuestos al agua del jagüey 3 presentó variaciones en la expresión de MT1 a pesar de las altas concentraciones de metales a las que los peces de los jagüeyes 1 y 2 fueron expuestos en el ensayo agudo a 120 horas (Gráfica 8). Esto probablemente se deba

a que, en el caso del hígado, esta respuesta a metales no es inmediata, sino que parece estar relacionada con el tiempo necesario para que los metales se acumulen en el tejido (Campana *et al.*, 2002). En el jagüey 2 todos los metales analizados (Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn) superaron los LMP de la NOM-001 y los de CE-CCA-001/89 para Cr y Hg, esta falta de inducción de metalotioneína podría estar vinculada a las altas concentraciones de metales, que el organismo ya no es capaz de eliminar de manera eficaz (Costa & Costa, 2008).

La distribución de los metales pesados en los órganos varía según las funciones fisiológicas y bioquímicas específicas de cada uno. Hamza-Chaffai *et al.* (1995) observaron que tanto el Cd como el Cu se acumulaban principalmente en el hígado, en lugar de en las branquias, en tres especies de peces: *Diplodus annularis*, *Scorpaena porcus* y *Scorpaena scrofa*, recolectados en una zona industrializada en la costa tunecina. En otro estudio, Marijić y Raspor (2006) reportaron que los niveles de Cd en el hígado de *Mullus barbatus* aumentaron 43 veces, tras ser recolectados en la bahía de Kaštela, una región impactada por aguas residuales urbanas, agrícolas e industriales. Asimismo, se encontró que, tras una exposición de corta duración de *Dicentrarchus labrax* a Cu por inyección intraperitoneal, el hígado fue el principal órgano en el que se almacenó el metal (Romeó *et al.*, 1997). Son varios los estudios donde se reportó una acumulación considerable de MT en todos los órganos examinados, siendo el hígado el que mostró los niveles más elevados tras exposiciones breves al Cd y al Cu. Esto sugiere que la inducción de MT en el hígado es el mecanismo principal para evitar el almacenamiento y desintoxicar metales en los peces.

En el jagüey 3, los resultados mostraron altas concentraciones de Cd, Cr, Hg, Pb y Zn.

El Cd es considerado el principal inductor de MT. George y Young (1986) estudiaron la platija y observaron que la inyección intraperitoneal de Cd a 10 °C generó un aumento significativo en los niveles de MT dentro de los primeros seis días tras la exposición. De manera similar, Hogstrand y Haux (1990) investigaron el pez ronco de rayas azules, donde las altas temperaturas (26–30°C) durante el experimento favorecieron una inducción más rápida de MT, registrándose niveles elevados en solo dos días después de la inyección de Cd, con un máximo en el hígado al sexto día.

Esto nos permite observar que Cd es un fuerte inductor de MT en peces, y el papel que tiene la temperatura en la respuesta fisiológica de los peces frente al Cd. A mayor temperatura, se incrementa la actividad metabólica y, con ello, la tasa de inducción de las MT. Asimismo lo reporta Taslima y colaboradores (2022) quienes mencionan que las altas temperaturas incrementan la actividad metabólica de los peces, lo que intensifica el impacto de los iones metálicos, como el Cd, sobre las enzimas y la membrana celular.

Aunque la regulación de los genes de MT ocurre principalmente a nivel de transcripción, lo que conlleva a un aumento significativo en los niveles de mRNA después de la exposición a metales pesados, la evaluación más común en los programas de biomonitorio se ha centrado en medir la cantidad total de proteína MT en extractos citosólicos parcialmente purificados (Costa *et al.*,2008).

Otro estudio que analiza el papel de Cd como un fuerte inductor de MT en *Danio Rerio* es el Chan y colaboradores en 2006, quienes realizaron un estudio *in vivo* en el que utilizaron embriones-larvas de pez cebra y evaluaron la expresión del gen MT desde la fertilización (8 hpf) hasta la etapa de embriones-larvas mediante PCR en tiempo real, donde sus resultados mostraron que Cd²⁺ ocasionó una inducción del ARNm de MT de 20 veces más en embriones-larvas de 8 hpf. A su vez realizaron un estudio *in vitro* utilizando la línea celular ZFL, donde Cd²⁺ demostró ser el inductor más potente del ARNm de MT (hasta 250 veces más), mientras que Cu²⁺ y Zn²⁺ mostraron una potencia similar de 50–100 veces en comparación con el grupo de control.

Por su parte, Chen *et al.* (2007) examinaron cómo la exposición a Cd y Zn induce la expresión de MT en larvas tempranas de pez cebra en diferentes momentos después de la fertilización (48, 72, 96 y 120 horas). La hibridación *in situ* en montaje completo reveló que el Zn estimuló la expresión de MT en diversas áreas como el canal olfativo, cerebelo, ceratos branquiales, hígado, células cloro y neuromastos de la línea lateral. Por otro lado, el Cd también provocó la expresión de MT en todas estas regiones, con la excepción del cerebelo.

Existen muy pocos estudios que investiguen la quelación de MT con Pb, ya que históricamente se ha considerado al Cd como el principal inductor de estas proteínas. En un estudio en pez sapo (*Halobatrachus didactylus*) las MT en el hígado y riñón se

vieron moduladas por la acumulación de Pb. El Pb, al ser un metal relativamente duro, muestra una menor afinidad por los grupos sulfhidrilo en comparación con metales más blandos como el Cd, el Cu o el Hg. Esto implica que proteínas como las MT son más efectivas en brindar protección contra la toxicidad de los metales blandos que frente a metales duros como el Pb (Campana *et al.*, 2002).

El nivel de expresión de las MT está dado también por factores como, estado del desarrollo, dieta y probablemente otros factores que aún no se han identificado (Tapia-Alamos, 2002). Asimismo, la expresión de la MT1 podría haberse visto influenciada por alteraciones en la región promotora del gen que regula su expresión, así como por cambios en el metabolismo provocados por estrés oxidativo y el estrés físico causado por contaminantes químicos y biológicos presentes en el agua (Ureña-Robles, 2007).

La síntesis de las MT puede ser inducida por diversas condiciones de estrés (temperaturas elevadas, radiación UV, infecciones, cambios en la salinidad), hormonas y mensajeros secundarios (glucocorticoides, insulina, AMPc), agentes inflamatorios (lipopolisacáridos, endotoxinas) y agentes citotóxicos (etanol, cloroformo, formaldehído, ácidos grasos, entre otros) (Tabla 1). Estos estímulos reflejan su papel en la respuesta celular a condiciones adversas y en la regulación metabólica (Ureña-Robles, 2007).

En la presente investigación no se observó correlación entre la inducción de MT1 y la concentración de metales en el agua de los jagüeyes (Gráfica 10-23), posiblemente debido a alteraciones en el metabolismo de los peces como resultado de la exposición a una mezcla compleja de estresores químicos y biológicos; Wong, *et al.* (2012) reportan que en el carcinoma hepatocelular (CHC), se ha observado una baja expresión de la MT, lo que podría estar relacionado con el estrés oxidativo, un factor que aumenta la vulnerabilidad de las células al daño en el ADN y a la apoptosis.

Las MT conforman un grupo de proteínas esenciales para la homeostasis celular, desempeñando un papel clave en la regulación de iones metálicos, la respuesta al estrés oxidativo y el control de la inflamación en una amplia variedad de organismos.

10.3 Altos niveles de Pb en Sangre de habitantes de 4 municipios en los Estados de Hidalgo y México

El límite de Pb en sangre según la NOM-199-SSA1-2000 vigente para la población no expuesta desde 2002 hasta la fecha es de 5 µg/d, límite que superan varios pobladores de Apaxco, Atotonilco, Atitalaquia y Tula (Tabla 4-7), lo que nos indica que los pobladores de estas localidades se encuentran altamente expuestos a contaminación por metales pesados (Pb) debido a las actividades industriales de la zona.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Pb en sangre entre los 4 municipios (Tabla 8). Las principales fuentes de exposición a Pb son pinturas que contiene este metal que se desprende en construcciones viejas, pinturas o esmaltes que se utiliza en las latas o cerámica, con lugares de trabajo que usan plomo como minas, refinerías, fundidoras, talleres de reparación de automóviles, fábricas de baterías, construcción civil, producción de vidrio, plásticos, caucho, plomería, imprentas, soldadura y cortadores de acero. Algunos productos de uso cotidiano pueden contener Pb como juguetes, medicinas tradicionales, cosméticos, utensilios de cocina (Poma, 2008). Adicionalmente, el Pb que se acumula en agua y suelo, puede transmitirse a los alimentos por absorción. La acumulación del Pb varía según la edad, el estado nutricional y la salud del individuo. Los adultos generalmente absorben 20% del Pb que ingieren, siendo la forma más común de exposición al Pb la ingesta de polvo, alimentos o agua contaminados. En cambio, la inhalación es la principal vía de exposición para aquellos que manejan este metal en su trabajo.

El Pb afecta la síntesis de hemoglobina al sustituir al Fe del grupo hemo, induciendo anemia, sobre todo en los niños expuestos a este metal. El Pb afecta todos los órganos y sistemas, actuando como agonista o antagonista de las acciones del calcio y se relaciona con proteínas que poseen los grupos sulfidrilos (como las MT), amina, fosfato y carboxilo. Dicho metal puede afectar los sistemas renal, endocrino y sanguíneo, tanto los encuestados en la presente investigación como sus familiares reportan cálculos renales, hipertensión, leucemia, asma, problemas cardíacos, daño pulmonar, alergias, epilepsia, presión alta, rinitis, arritmia cardíaca, cáncer, entre otras (Gráficas 24-27). Los efectos inmediatos son neurológicos, pero el envenenamiento

en la infancia puede conducir más tarde a problemas renales, hipertensión arterial y problemas reproductivos (Poma, 2008).

10.4 Impacto del polimorfismo rs8052394 del gen MT1A en humanos

La frecuencia del alelo rs8052394 (G) del gen MT1A en los municipios analizados fue de 33% (Tabla 14). La frecuencia de alelo se ha estudiado en poblaciones alrededor del mundo encontrando asociaciones con diversos padecimientos. La frecuencia del alelo mutante G observada en la población mexicana analizada, fue estadísticamente mayor a las reportadas en India ($p=0.0013$), Irán ($p=0.0006$), Estados Unidos ($p=0.0001$), la Unión Europea ($p=0.0006$), Italia ($p=0.0006$) y España ($p=0.0025$), pero similar a la reportada en Colombia ($p=0.2425$), China ($p=0.5392$) y Nepal ($p=0.0792$) (Tabla 14).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden alterar la capacidad de desintoxicación de las enzimas MT, ya que comprometen su actividad, aunque aún se conoce poco sobre cómo los SNP afectan la función de las enzimas MT, ya se han investigado polimorfismos de MT, como MT1A, MT2A, MT1B, MT1M, MT3 y MT4 en relación con diversas enfermedades, incluyendo diabetes mellitus, aterosclerosis y cáncer (Imagen 7). Sin embargo, el impacto de los polimorfismos del gen MT1A en la toxicidad de metales como Pb, Cd, Zn y Al sigue siendo poco comprendido (Aguilar-Méndez, 2021).

El polimorfismo rs8052394, que implica un cambio de adenina a guanina (A/G) en el gen MT1A, ha sido asociado con el riesgo de toxicidad por metales pesados, como Cd y Hg, en distintas poblaciones (Tabla 14) (Aguilar-Méndez, 2021; Wang et al., 2012). El SNP rs8052394 ha sido asociado también con distintas enfermedades, aunque sus efectos parecen variar según el tipo de trastorno y la población estudiada, lo que indica que podría desempeñar un papel pleiotrópico en diversos padecimientos (Crocco, *et al.*, 2025).

Recientemente se investigó el efecto del polimorfismo MT1A rs8052394 en los niveles de Pb, Cd, Zn y Al en 100 trabajadores de diversas fábricas de Jodhpur, India, expuestos ocupacionalmente a metales pesados. El estudio reveló que los individuos con el genotipo GG presentaron niveles más bajos de Pb, Zn y Al, pero niveles más altos de Cd en comparación con los genotipos AA y AG. Con base en estos hallazgos,

los autores concluyeron que existe una asociación significativa entre los polimorfismos de un solo nucleótido del gen MT1A y los niveles de Cd y Zn ($p=0.006$, $p=0.031$). Además, señalaron que este SNP podría estar relacionado con una mayor acumulación de metales, lo que podría aumentar los efectos tóxicos en individuos expuestos a estas sustancias (Singh y colaboradores, 2020).

Chuang reportó algo similar en el 2018, él investigó la relación entre los polimorfismos del VDR, MT1A, MT2A y la toxicidad del Pb en el sistema nervioso sensorial en 181 trabajadores con exposición crónica a dicho metal, encontrando que los portadores del genotipo GG para MT1A rs8052394 presentaron efectos neuroprotectores contra el Pb.

Por su parte, un estudio en 2012 en 515 profesionales de la odontología ocupacionalmente expuestos a la amalgama dental cuantificó el Hg total en muestras de cabello para estimar la inhalación diaria de metilmercurio (MeHg), descubriendo que los polimorfismos rs8052394 (GA y GG) de MT1A estaban asociados a niveles bajos de Hg en cabello en comparación con los genotipos AA (Wang, *et al*, 2012).

El polimorfismo rs8052394 del gen MT1A también ha sido vinculado como un posible locus de predisposición genética a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Yang *et al.* (2008) analizaron siete polimorfismos SNP en los genes MT1A, MT1B, MT1E y MT2A en una muestra de 851 individuos chinos, compuesta por 397 pacientes con DM2 y 454 controles. Encontraron que el alelo G del SNP rs8052394 en MT1A estaba significativamente asociado con la incidencia de DM2, mientras que los otros seis SNP no mostraron diferencias significativas entre los grupos y asociaron el SNP rs8052394 con alteraciones en la actividad de superóxido dismutasa sérica (SOD).

En los pacientes con DM2, los portadores de los genotipos GG o GA del SNP rs8052394 presentaron una actividad de SOD más baja en comparación con los portadores del genotipo AA. La SOD es una enzima clave en la defensa antioxidante, cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. En los pacientes diabéticos, se ha observado una sobreproducción de superóxido, lo que deteriora el sistema antioxidante y provoca daño oxidativo en múltiples órganos, contribuyendo a la patogénesis de las complicaciones diabéticas.

Existen dos formas principales de SOD activadas por metales: SOD de zinc/cobre, predominante en el citosol, y SOD de manganeso. La metalotioneína desempeña un papel esencial en la homeostasis de Zn y Cu, por lo que alteraciones genéticas en su expresión pueden afectar la disponibilidad de estos metales para enzimas como la SOD de zinc/cobre. Esto podría explicar los niveles reducidos de SOD observados en pacientes con DM2 y su contribución al estrés oxidativo sistémico.

El estrés oxidativo persistente, a su vez, puede inducir la producción de citocinas inflamatorias, exacerbando las respuestas inmunes y acelerando el desarrollo de complicaciones diabéticas. Por lo tanto, las alteraciones funcionales en MT podrían desempeñar un papel crítico en la desregulación del equilibrio antioxidante e inflamatorio en pacientes con DM2. Estudios realizados en Nepal han reportado resultados similares (Khatiwada, *et al.*, 2016). Además, en pacientes ancianos con DM2, esta asociación también se ha observado, caracterizándose por inflamación crónica y niveles insuficientes de Zn (DiSilvestro, 2000).

Rahman y colaboradores (2022) mencionan que en particular el rs8052394, está asociado con [la](#) DM2 en varias poblaciones de todo el mundo, ya que este SNP es una variante genética no sinónima en la que una transición entre las bases A y G puede estar vinculada al estrés oxidativo, un factor que podría contribuir al desarrollo de la DM2. A su vez, examinaron los efectos estructurales de la sustitución de aminoácidos provocada por el alelo rs8052394-G en la proteína MT1A, encontrando que esta variante genética afecta desfavorablemente la conformación de la proteína, reduciendo su estabilidad.

Por otro lado, Crocco, *et al.*, 2025 investigaron la relación entre la variabilidad de los genes MT y la fragilidad, un síndrome geriátrico complejo caracterizado por una disminución de la reserva fisiológica; identificando que la variante genética rs8052394 influye en el riesgo de dicho síndrome, observando que las mujeres portadoras del alelo G tenían un menor riesgo de pasar de un estado no frágil a un estado prefrágil en comparación con las homocigotas para el alelo A. Mencionan que el alelo G posiblemente ejerce un efecto protector contra el riesgo de fragilidad en mujeres, esto debido a su impacto en la función de la proteína MT1A, que regula la disponibilidad de Zn intracelular. MT1A actúa como reservorio de Zn, y su expresión está influida por los niveles de este mineral esencial, que es crítico para procesos como la función

muscular, inmunológica, cognitiva y la respuesta inflamatoria. En personas mayores, la homeostasis del Zn se ve alterada debido a deficiencias nutricionales y altos niveles de MT, lo que reduce la disponibilidad de Zn y contribuye al riesgo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento. El alelo G podría desestabilizar la proteína MT1A, disminuyendo su capacidad para retener Zn y aumentando su disponibilidad intracelular, lo que favorece las vías inmunológicas e inflamatorias.

El alelo A en el gen de MT1A también ha sido asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer, así como lo reporta Timilsina y colaboradores (2013), quienes demostraron una conexión entre el genotipo AA del SNP rs8052394 y un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas orales (OSCC) en personas que consumen nuez de areca y tabaco. Según los investigadores, este genotipo podría estar relacionado con una capacidad alterada de MT1A para regular el almacenamiento y la homeostasis de Zn y Cu, lo que afecta a moléculas dependientes de estos metales, como la proteína p53. Esta alteración en la función de MT1A puede generar un estrés oxidativo continuo y contribuir a una inflamación crónica, proceso que favorece la oncogénesis mediante la activación constante de las vías de señalización de la proteína quinasa, lo que puede inducir el desarrollo de tumores.

El tabaquismo es también una causa importante de estrés oxidativo, lo que podría afectar la expresión del gen MT1A. Wong y colaboradores en el 2012 en su estudio con 102 pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) y 191 controles sanos, analizaron seis variantes genéticas de MT1A utilizando la tecnología TaqMan Reportando que las personas con alelo A rs8052394, junto con los que fumaban, tenían un riesgo 2,25 veces mayor de desarrollar CHC.

Como menciona Babei y colaboradores (2016), la susceptibilidad individual desempeña un papel crucial en la magnitud y extensión de los efectos adversos para la salud provocados por agentes ambientales como lo es la contaminación por metales. Los estudios mencionados anteriormente han demostrado que los SNP en MT pueden alterar los procesos de desintoxicación de metales pesados en los seres humanos y desarrollar diversas enfermedades, encontrando una relación entre ellos: la presencia del alelo G se ha asociado con una mayor desintoxicación de metales como Pb, Al y Hg, pero con un mayor riesgo a padecer DM2; mientras que el alelo A está asociado a una mejor desintoxicación de metales como el Zn y el Cd, pero un

mayor riesgo a padecer cáncer. No obstante, dichos estudios son aún muy limitados y, hasta donde se tiene conocimiento, no existe ningún trabajo que caracterice estos polimorfismos en la población mexicana, por lo que nuestros resultados sugieren de manera preliminar que esta población podría ser particularmente vulnerable a la intoxicación de ciertos metales pesados y otros padecimientos derivados de dicho polimorfismo como lo es la DM2.

Ante esta problemática, se propone que los sistemas de salud de la región de emergencia ambiental implemente y promuevan dietas ricas en antioxidantes naturales que puedan ser suplementadas con vitaminas que contribuyan a recuperar el estado redox celular en la población. Adicionalmente, los trabajadores ocupacionalmente expuestos a metales deben contar una protección que reduzca la exposición por contacto e inhalatoria a los metales y otros compuestos potencialmente peligrosos.

A su vez, se requiere un plan de manejo ambiental que incluya la participación de biotecnólogos especializados en la remoción de compuestos tóxicos mediante técnicas de fito y biorremediación.

La capacidad de las MT para unirse a metales pesados ofrece una oportunidad prometedora para desarrollar enfoques específicos de biorremediación. Su bajo peso molecular, la presencia de residuos con carga negativa y sus características hidrofílicas las hacen aptas para unirse a iones metálicos con carga positiva. Además, su vida media y estabilidad térmica sugieren que pueden mantener sus funciones en ambientes contaminados durante largos períodos. Aprovechando estas propiedades, las MT podrían utilizarse para secuestrar e inmovilizar metales pesados en entornos contaminados, contribuyendo a la bioremediación. Interesados en esto, Tasleem y colaboradores (2023) estudiaron las modificaciones postraduccionales (PTM) en MT derivadas de *P. putida* revelando mecanismos reguladores que podrían mejorar esta capacidad de unión a metales. Identificaron que mecanismos de PTM como fosforilación, glicosilación y palmitoilación sugieren una red reguladora compleja que puede influir en estas interacciones y a su vez mencionan que manipular estos sitios de modificación podría permitir diseñar variantes de MT con capacidades de biorremediación mejoradas.

En el campo de la fitorremediación, las microalgas están recibiendo una atención creciente debido a su notable diversidad genética, funcional y química. Su capacidad para crecer y producir biomasa a un ritmo superior al de las plantas terrestres, junto con su elevada relación superficie-volumen, les permite absorber metales pesados con mayor eficacia que organismos de mayor tamaño. Los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Scenedesmus* de la clase *Chlorophyta* se emplean con frecuencia en la remediación de estos contaminantes. Entre las propiedades bioquímicas esenciales para la captación de metales, destacan los transportadores activos primarios, las proteínas de unión a metales (como las MT) y los péptidos de unión a metales producidos por acción enzimática, los cuales deberían ser de principal interés (Balzano, *et al*, 2020).

11. CONCLUSIONES

Las condiciones del agua en los jagüeyes de la REFB en relación con las concentraciones de metales son preocupantes, destacando principalmente el Jagüey 2, hallazgo que resalta la necesidad de implementar medidas de monitoreo y control en la zona. En cuanto a la expresión de la MT1 en *Danio rerio*, solo se observó un incremento significativo en el hígado de los peces expuestos al agua del Jagüey 3 durante el ensayo agudo a 120 horas, esto debido a que el hígado responde como el principal órgano de desintoxicación. Este aumento sugiere una respuesta adaptativa del organismo frente a la presencia de metales pesados en su entorno acuático y podría estar relacionada con el grado de toxicidad de dichos metales, lo que sugiere que la dinámica de inducción depende no solo de la acumulación, sino también de las características específicas del metal y de las condiciones ambientales, así como de diversos factores no solo externos, sino también del propio metabolismo celular.

En los jagüeyes 1 y 2 no hay inducción de MT en hígado probablemente debido a que las altas concentraciones de contaminantes en el agua comprometen la capacidad de respuesta de los órganos de desintoxicación.

Los municipios de Atitalaquia, Atotonilco, Tula de Allende y Apaxco representan una zona altamente contaminada por la presencia de diversas industrias, lo cual se ve reflejado en las altas concentraciones de Pb en sangre de dicha población por encima de 5 ug/dL.

La frecuencia de la variante genética MT1A rs8052394 en esta población expuesta a metales muestra una alta presencia del alelo G en comparación con otras poblaciones alrededor del mundo, lo que sugiere que este polimorfismo en MT1A presenta diferencias étnicas asociadas posiblemente a la historia evolutiva de cada población, lo que lleva a que algunas poblaciones eliminen más eficientemente ciertos metales pesados, mientras que otras sean más susceptibles a la bioacumulación de otros como el Cd, Zn y a padecer enfermedades como la diabetes tipo 2. Sin embargo, la presencia del alelo silvestre A también ha sido asociada con un mayor riesgo a padecer cáncer y síndrome de fragilidad.

Se requiere realizar un estudio con mayor número de individuos representativo de distintos grupos étnicos en México para establecer la frecuencia alélica del SNP rs8052394 en nuestra población, así como estudiar posibles asociaciones de esta variante con las enfermedades que aquejan a nuestra población.

12. REFERENCIAS

1. Aguilar Méndez, J. (2021). Determinación de la frecuencia del polimorfismo rs8052394 del gen de la metalotioneína MT1A en una muestra de la población colombiana. Universidad de los Andes. <http://hdl.handle.net/1992/55303>
2. American Veterinary Medical Association. (2020). AVMA Directrices para la eutanasia de animales: 2020 Edition. <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policias/avma-guidelines-euthanasia-animals>
3. Babaei, J., Jalali, A., Galehdari, H. & Saki, A. (2016). MT1A (A>G), MT1A (C>G), MT1M (A>C) and MT4 (G>A) single nucleotide polymorphism allele frequencies in Iranian populations, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:5, 963-969, DOI: 10.1080/13102818.2016.1207487
4. Balzano, S., Sardo, A., Balsio, M., Chahine, T., Dell'Anno, F., Sansone, C. Y Brunet., C. (2020). Microalgal Metallothioneins and Phytochelatins and Their Potential Use in Bioremediation. *Microbiol.*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00517>
5. Benhalima, Lamia & Amri, Sandra & Bensouilah, Mourad & OUZROUT, R.. (2020). HEAVY METAL RESISTANCE AND METALLOTHIONEIN INDUCTION IN BACTERIA ISOLATED FROM SEYBOUSE RIVER, ALGERIA.

- Applied Ecology and Environmental Research. 18. 1721-1737. 10.15666/aeer/1801_17211737.
6. Brambila, E. & González, E. (1993). La metalotioneínas: ¿Cestos de basura o proteínas clave en el metabolismo celular? *Elementos*, 19 (3), 3-9. 18. 18. file:///D:/18.%20Las%20metalotioneinas%20Cestos%20de%20basura%20o%20proteinas%20clave%20en%20el%20metabolismo%20celular.pdf
 7. Cadavid-Muñoz, N., & Arango-Ruiz, Á. (2020). El mercurio como contaminante y factor de riesgo para la salud humana. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(2), 280-296. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492020000200280&script=sci_arttext
 8. Campana, O., Sarasquete, C., & Blasco, J. (2003). Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 55(1), 116–125. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00093-3](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00093-3)
 9. Carrasco, G, B. y Vargas J, J. T. (2015). Incineración de residuos en cementeras como una falsa solución inserta en los mercados de carbono, *Entre textos*, vol. 6 (18), pp. 1-13, <http://entretextos.leon.uia.mx/num/18/PDF/ENT18-3>.
 10. Carvajal-Mafla, V. A. (2022). Manual para el manejo del pez cebra (*Danio rerio*) en laboratorios de investigación biomédica. [Tesis de licenciatura, Universidad San Francisco De Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/11939/1/210419.pdf>
 11. Chan, K. M., Ku, L. L., Chan, P. C.-Y., & Cheuk, W. K. (2006). Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Marine Environmental Research*, 62, S83–S87. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.012
 12. Chang, Y. P. (2004). The Study of Metallothionein Gene Regulation in Zebrafish. [Tesis de Maestría. The Chinese University of Hong Kong]. <https://core.ac.uk/download/pdf/48536908.pdf>
 13. Chen, W. Y., John, J. A., Lin, C. H., & Chang, C. Y. (2007). Expression pattern of metallothionein, MTF-1 nuclear translocation, and its dna-binding activity in zebrafish (*Danio rerio*) induced by zinc and cadmium. *Environmental toxicology and chemistry*, 26(1), 110–117. <https://doi.org/10.1897/06-153r.1>

14. Chiodi-Boudet, L.N., Mendieta, J., Polizzi, P., Chisari, A. y Gerpe, M. (2010). Analisis por Western blot de metalotioneínas en *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) expuesto a distintas concentraciones de cadmio. CONICET. <https://bicyt.conicet.gov.ar/fichas/produccion/9030483>
15. Chuang, H. (2018). The influence of Vitamin D receptor, metallothionein 1A and 2A gene polymorphisms on the lead toxicity to the sensory nervous system in the chronic lead-exposed workers. *Environmental Health Perspectives* 2018(1). <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/isesisee.2018.P02.4170>
16. Cipriano, C., Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Muti, E., Gasparini, N., Cardelli, M., Monti, D., Mariani, E. & Mocchegiani, E. (2006). Los polimorfismos en la región codificante del gen MT1a están asociados con la longevidad en la población femenina del centro de Italia. *Biogerontología*; 7: 357-365. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-006-9050-x>
17. Costa, P. M., Repolho, T., Caeiro, S., Diniz, M. E., Moura, I., & Costa, M. H. (2008). Modelling metallothionein induction in the liver of *Sparus aurata* exposed to metal-contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 117–124. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.05.012
18. Costa, PM, & Costa, MH. (2008). Respuestas bioquímicas e histopatológicas a la toxicidad por cadmio in vivo en *Sparus aurata*. *Ciencias marinas*, 34(3), 349-361. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802008000300008&lng=es&tlng=es.
19. Crocco, P., De Rango, F., La Grotta, R., Passarino, G., Rose, G. y Dato, S. (2025). La variabilidad del gen metalotioneína-1A (MT1A) puede desempeñar un papel en la fragilidad femenina: un estudio preliminar. *Genes* , 16 (1), 15. <https://doi.org/10.3390/genes16010015>
20. De la Rosa, R, J, J., García, Y, S, y De León, C, A.P. (2019). Políticas públicas con perspectiva territorial (1.ªed.). Universidad Autónoma Metropolitana. <https://casadelibrosabiertos.uam.mx/gpd-politicas-publicas-con-perspectiva-territorial.html>
21. DiSilvestro, R. A. (2000). Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1509S-1511S. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002231662214112X>
22. Estrada-Rivera, A. (2018). Evaluación toxicológica del agua residual textil

- (proceso Denim) vertida al río Atoyac. [Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/7620>
23. García-Rico, L., Robles-Burgeño, M., & Valenzuela-Soto, E. M. (1999). Las metalotioneinas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 15(2), 113-120. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/32794>
24. George, S. G., & Young, P. (1986). The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 83(1), 37-44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0742841386900101>
25. George, S.G. y Young, P. (1986). The time course of effect of cadmium and 3-methylchloanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* C 83,37–44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0742841386900101>
26. Giacconi, R., Simm, A., Santos, A. N., Costarelli, L., Malavolta, M., Mecocci, P., Piacenza, F., Basso, A., Fulop, T., Rink, L., Dedoussis, G., Kanoni, S., Herbein, G., Jajte, J., & Mocchegiani, E. (2014). Influence of +1245 A/G MT1A polymorphism on advanced glycation end-products (AGEs) in elderly: effect of zinc supplementation. *Genes & nutrition*, 9(5), 426. <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0426-2>
27. Gutiérrez, D. L. (2020). Proteínas relevantes en la homeostasis de metales pesados en el hongo oportunista *Fusarium oxysporum*. [Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=267331>
28. Hamza-Chaffai, A., Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C., El-Abed, A., 1995. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. C* 111, 329–341. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/074284139500058V>
29. Hogstrand, C., & Haux, C. (1990). Metallothionein as an indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. *Journal of Experimental Marine*

30. Hogstrand, C., Haux, C. (1990). Metallothionein as an indicator of heavy metal exposure in two subtropical fish species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138, 69–84. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002209819090177E>
31. Juárez-Rebollar, D. & Méndez-Armenta, M. (2014). Aspectos funcionales de la metalotioneína en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)*. 19(1), 34-41. <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2014/ane141f.pdf>
32. Khatiwada S, Tiwari P, Shrestha R, Das PL, Tamang MK, et al.. (2016) Polymorphism in Metallothionein 1A Gene in Nepalese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Dia Res Ther* 2(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/2380-5544.116>
33. Krizkova, S., Kepinska, M., Emri, G., Eckschlager, T., Stiborova, M., Pokorna, P., Heger, Z., & Adam, V. (2018). An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena. *Pharmacology & therapeutics*, 183, 90–117. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.004>
34. López, E. H. S. (2007). Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2), 67-72. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2007/reb072d.pdf>
35. Marijić, V. F., & Raspor, B. (2006). Age- and tissue-dependent metallothionein and cytosolic metal distribution in a native Mediterranean fish, *Mullus barbatus*, from the Eastern Adriatic Sea. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 143(4), 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.05.019>
36. Morales-Tecuapacho, D. (2023). Daño al DNA en sangre de pobladores ambientalmente expuestos a plomo en la región Tula- Apaxco. [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala].
37. Monteith, A., & Skaar, E. (2021). The impact of metal availability on immune function during infection. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32 (11), 16-928. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.08.004>.
38. Montoya, N., Casas, P., & Wandurraga, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia y Tecnología para la salud visual y ocular*, 8(1), 77-88. <https://saludvisual.lasalle.edu.co/article/view/1660>

39. Narvaéz-Porras, O. & Cano-Valle, F. (2004). CENIZAS VOLCÁNICAS: CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(3), 232-238. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000300009&lng=es&tlng=es.
40. Nava-Ruíz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16(3). https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Aqcd%3A12%3A10390540/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Aqcd%3A88923981&crl=c&link_origin=scholar.google.es
41. NCBI. (2016). dbSNP short genetic variations. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
42. OECD. (2019). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en.html
43. Olivares Arias, V., Valverde Som, L., Quiros Rodríguez, V., García Romero, R., Muñoz, N., Navarro Alarcón, M., & Cabrera Vique, C. (2015). Níquel en alimentos y factores influyentes en sus niveles, ingesta, biodisponibilidad y toxicidad: una revisión. *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 87-101. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2014.917383>
44. Perini, JA, Cardoso, JV, Knesse, A. d. O., Pessoa-Silva, FO, Vasconcellos, ACS d., Machado, DE, y Basta, PC (2024). Polimorfismos de un solo nucleótido asociados con los niveles de mercurio y los síntomas neurológicos: una descripción general. *Toxics*, 12 (3), 226. <https://doi.org/10.3390/toxics12030226>
45. Plattner, H. Y Hentschel, J. (2014). Biología celular. (4ta Ed.) Editorial panamericana
46. Poma, P. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69(2), 120-126. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000200011&lng=es&tlng=es.
47. Rahman-Khan, F. y Sulaima-Alhewairini, S. (2019). El pez cebra (Danio rerio) como organismo modelo. IntechAbierto. doi: 10.5772/intechopen.81517

48. Raudenska, M., Gumulec, J., Podlaha, O., Sztalmachova, M., Babula, P., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R., & Masarik, M. (2014). Polimorfismos de metalotioneína en procesos patológicos, *Metalómica*, 6(1), 55–68, <https://doi.org/10.1039/c3mt00132f>
49. Ríos, E., Mejía-Ruiz, H., y Álvarez-Castañeda, S. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Revista Ciencia*, 01, 5-13. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf
50. Rodríguez, E. (2011). Inducción de metalotioneínas como biomarcador de exposición in situ a metales en *Ambystoma mexicanum*. [Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México]. https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000666714/3/0666714_A1.pdf
51. Rodríguez-Arnaiz R. 2004. Metabolismo de las toxinas ambientales (La Ciencia Para Todos n° 199). *Fondo de Cultura Económica*; 1a edición. Pag 113-120.
52. Romeo, M., Cosson, R.P., Gnassia-Barelli, M., Risso, C., Stien, X., Lafaurie, M., 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Mar. Environ. Res.* 44, 275–284. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014111369700007X>
53. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. (1989). CE-CCA-001/89, Criterios Ecológicos de Calidad del Aguas. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4837548&fecha=13/12/1989#gsc.tab=0
54. Secretaria de Salud. (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000, Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=751988&fecha=18/10/2002#gsc.tab=0
55. SEMARNAT. (2021). NORMA Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5645374&fecha=11/03/2022#gsc.tab=0

56. Singh, P., Mitra, P., Goyal, T., Kumar, P. V. K., Sharma, S., & Sharma, P. (2020). Effect of metallothionein 1A rs8052394 polymorphism on lead, cadmium, zinc, and aluminum levels in factory workers. *Toxicology and Industrial Health*, 36(10), 816-822. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0748233720947518>
57. Tapia-Alamos, L. (2002). Función de las Metalotioneínas en el metabolismo celular de cobre. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/106697/Funci%C3%B3n-de-las-Metalotione%C3%ADnas-en-el-metabolismo.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
58. Tasleem, M., El-Sayed, A. A. A., Hussein, W. M., & Alrehaily, A. (2023). *Pseudomonas putida* Metallothionein: Structural Analysis and Implications of Sustainable Heavy Metal Detoxification in Madinah. *Toxics*, 11(10), 864. <https://doi.org/10.3390/toxics11100864>
59. Taslima, K., Al-Emran, M., Shadiqur, M., Hasan, J., Ferdous, Z., Rohani, F., & Shahjahan, M. (2022). Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish – A review. *Toxicology Reports*, 9, 858-868, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.04.013>.
60. Tellez.López, C. (2024). Evaluación de la calidad del agua y toxicidad de los jagüeyes de la Reserva Estatal Flor del Bosque, Puebla. [Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
61. Thirumoorthy, N., Shyam, A., Manisenthil, K. *et al.* (2011). Una revisión de las isoformas de metalotioneína y su papel en la fisiopatología. *World J Surg Onc* 9 , 54. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-54>
62. Timilsina, U., Singh, K.P., Tamang, H.K., Thapa, S. (2013). Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis of nsSNP rs8052394 of metallothionein1A gene., *Biomedical Research*, 24(1), 67-71. <https://www.alliedacademies.org/abstract/polymerase-chain-reaction--restriction-fragment-length-polymorphismanalysis-of-nssnp-rs8052394-of-metallothionein-1a-gene-1066.html>
63. Ureña-Robles, R. (2007). Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación. [Tesis de Doctorado. Universitat de València]. <https://producciocientifica.uv.es/documentos/5eb09cca299952764111f87e>

64. Wang, Y. (2011). A Gene-environment Study of Metallothionein Single Nucleotide Polymorphisms, Mercury Biomarker Levels and Peripheral Nerve Function. [Tesis Doctoral dissertation, University of Michigan]. <https://www.proquest.com/openview/2429a661d282176b58b6353e2c496681/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
65. Wang, Y., Goodrich, J. M., Gillespie, B., Werner, R., Basu, N., & Franzblau, A. (2012). An investigation of modifying effects of metallothionein single-nucleotide polymorphisms on the association between mercury exposure and biomarker levels. *Environmental health perspectives*, 120(4), 530–534. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104079>
66. Wong, R. H., Huang, C. H., Yeh, C. B., Lee, H. S., Chien, M. H., & Yang, S. F. (2013). Effects of metallothionein-1 genetic polymorphism and cigarette smoking on the development of hepatocellular carcinoma. *Annals of surgical oncology*, 20(6), 2088–2095. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2456-6>
67. Yang, C. C., Lin, C. I., Lee, S. S., Wang, C. L., Dai, C. Y., & Chuang, H. Y. (2020). The association of blood lead levels and renal effects may be modified by genetic combinations of Metallothionein 1A 2A polymorphisms. *Scientific reports*, 10(1), 9603. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66645-y>
68. Yang, L., Li, H., Yu, T., Zhao, H., Cherian, M. G., Cai, L., & Liu, Y. (2008). Polymorphisms in metallothionein-1 and-2 genes associated with the risk of type 2 diabetes mellitus and its complications. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E987-E992. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.90234.2008>
69. Yang, R., Roshani, D., Gao, B., Li, P., & Shang, N. (2024). Metallothionein: A Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(7), 825. <https://doi.org/10.3390/antiox13070825>

13. ANEXOS

Tabla 10. Secuencias de primers y enzima de restricción del polimorfismo seleccionado (MT1A).

SNP	dbSNP	Secuencia de primers	Alelo	Enzima de	Producto de
-----	-------	----------------------	-------	-----------	-------------

			silvestre/ mutación	restricción	PCR (pb)
MT1A	rs8052394	F: CAAACTGAGGCCAAGAGTGCACCA R: TGACCTGAGGCAGGTGCCTGATTT	A/G	PstI	743