

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad de desechos mineros en Huautla, Morelos

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A:

Claudia Cristina Valenzuela Inzunza

CODIRECTORES DE TESIS

Dra. María Marcela Osorio Beristain
Dra. Lynna Marie Kiere

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2020

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	1
I. Marco teórico	3
I.1 Estudios hematológicos	3
I.2 Eritrocitos aviares	3
I.3 Hemoparásitos en aves	6
I.4 Efectos asociados a los metales pesados	8
I.5 Minería en México	9
II. Justificación	11
III. Hipótesis y predicciones	12
IV. Objetivos	13
V. Materiales y métodos	14
V.1 Sitio de estudio	14
V.2 Especies de estudio	15
V.3 Captura de aves y toma de muestras sanguíneas	16
V.4 Preparación de muestra y captura de fotografías	17
V.5 Análisis sanguíneo	17
V.6 Análisis de datos	20
VI. Resultados	20
VI.1 Hematocrito	21
VI.2 Caracterización y conteo de eritrocitos normales y anormales	22

VI.2.1 Eritrocitos Aglobados	25
VI.2.2 Eritrocitos Policromáticos Normales	25
VI.2.3 Eritrocitos Parasitados	26
VI.3 Comparación entre sitios	27
VII. Discusión	29
VIII. Perspectivas	33
IX. Agradecimientos	33
X. Literatura citada	34
XI. Votos probatorios	37

RESUMEN

Para conocer el estado de salud de un individuo es importante observar las características hematológicas que presenta. Estos valores, incluyendo el hematocrito (proporción de la sangre compuesta por eritrocitos), atipias morfológicas en células sanguíneas (tanto del núcleo como del citoplasma), índice de policromacia (proporción de eritrocitos inmaduros) y el grado de parasitemia (presencia de parásitos) en eritrocitos, sirven como herramientas de diagnóstico para enfermedades y como parámetros generales de salud. Estos valores varían dependiendo de los hábitos de alimentación y conductuales, tanto a nivel individual como a nivel de especie, por lo que es importante establecer valores de referencia en cada especie. Se conoce que en los eritrocitos aviares es común encontrar una proporción de atipias morfológicas nucleares. Sin embargo, la exposición constante a contaminantes provoca alteraciones en estas proporciones, por lo que las anomalías nucleares funcionan como marcadores hematológicos y son de gran relevancia para conocer efectos sutiles de factores que a largo plazo pueden ser perjudiciales para los organismos.

En muestras sanguíneas de *Icterus pustulatus* (calandria de dorso rayado) y *Molothrus aeneus* (Tordo de ojo rojo), evaluamos valores de hematocrito, índices de policromacia, atipias morfológicas nucleares y citoplasmáticas de eritrocitos, y eritrocitos con presencia de parásitos comúnmente encontrados. Particularmente *Plasmodium* sp. y *Haemoproteus* sp. que son agentes causales de la malaria aviar y la pseudomalaria aviar, respectivamente. Las aves fueron muestreadas cerca del poblado de Huautla, municipio Tlalquiltenango, en zonas con diferente proximidad a residuos tóxicos remanentes de actividades mineras. Colectamos las muestras sanguíneas en mayo y junio del 2017 en cuatro sitios; Jal Huautla, Jal Rancho Viejo, Río Rancho Viejo y Quilamula, de las cuales se obtuvieron tubos capilares y frotis sanguíneo. Los análisis se realizaron por medio de fotografías de los frotis, con ayuda del programa Fiji. El análisis de datos se realizó con el programa R, con pruebas estadísticas no paramétricas. Se encontraron diferencias significativas en los valores al comparar entre especies, *I. pustulatus* muestra valores elevados en índice de policromacia ($P= 7.564 \times 10^{-4}$), presencia de hemoparásitos ($P= 2.6.34 \times 10^{-6}$) y presencia de eritrocitos aglobados ($P= 0.0106$), a diferencia de *M. aeneus* que tuvo proporciones bajas. Por otro lado, no se encontró diferencias entre especies en los valores de hematocrito, ni en atipias morfológicas nucleares. Al comparar entre los sitios con diferente cercanía a los desechos mineros no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables. Posiblemente los cambios en los valores de *I. pustulatus* y *M. aeneus* se deben a diferencias intrínsecas entre especies (fisiológicas, eritropoyesis, alimentación). De igual manera, estos cambios se podrían presentar como consecuencia de factores estresantes con los que se relacionan de

diferente forma como el cuidado parental, la reproducción, diferencias en coloración y estrés oxidante. La presencia de contaminantes por agroquímicos o posibles alteraciones antropogénicas en el sitio control (Quilamula) podría dar como resultado la falta de discrepancia entre las variables estudiadas en los sitios.

I. MARCO TEÓRICO

Estudios hematológicos

La hematología es el estudio de la sangre y los tejidos formadores de sangre. Los perfiles hematológicos son considerados como herramientas de diagnóstico indispensables para evaluar la salud de los individuos, permiten evaluar la respuesta hematológica a la enfermedad y aunque rara vez ofrece un diagnóstico etiológico, proporciona un pronóstico del estado de salud. El tener perfiles hematológicos de diversos organismos es de gran importancia para establecer valores de referencia para poder detectar poblaciones afectadas al comparar estos valores (Samour, 2005). Una de las actividades que se realiza en un estado hematológico son los análisis de eritrocitos. Los eritrocitos son las células encargadas de transportar oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) por el torrente sanguíneo, y mediante diferentes tipos de cuantificación, se puede evaluar qué tan efectiva es su función. Estas cuantificaciones incluyen el conteo de glóbulos rojos (RBC), la cuantificación de la cantidad de hemoglobina (HGB) la proteína encargada del transporte de oxígeno, y el hematocrito (HCT), y medidas de los eritrocitos y concentración de hemoglobina promedio de las células. Los niveles de hemoglobina, hematocrito y el conteo de RBC también sirven para conocer tanto el estado de salud de los individuos como del hábitat en que se encuentra un conteo de RBC alto es normal en organismos que habitan lugares con altitudes elevadas mientras que un RBC bajo o niveles de hematocrito o de hemoglobina bajos generalmente indican algún tipo de anemia (Rodak, 2005). Los elementos formes, que son los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, presentan variaciones dependiendo de la clase a la que pertenecen los organismos. Los resultados obtenidos de la cuantificación de estos elementos formes, anomalías en su tamaño y forma, también pueden ser indicativos para anemia (Rodak, 2005).

Eritrocitos aviares

Predominantemente los eritrocitos aviares son ovoides, con un núcleo central compuesto de cromatina densa (al utilizar una tinción de Wright-Giemsa se aprecian de color púrpura) que se condensa a medida que el eritrocito envejece. Normalmente entre el 0.1 y 1.0% son anucleados (Clark, 2015). El tamaño y las proporciones de eritrocito y núcleo varían entre especies, y presentan manchas citoplasmáticas uniformemente eosinofílicas (Samour, 2005). No obstante, se pueden presentar atipias morfológicas, generalmente en el núcleo. Clark realizó en el 2015 un estudio donde comparó la sangre de 70 individuos que comprendían 50 especies y 16 géneros de aves, encontrando morfologías variantes en el 50% de los

individuos; las deformaciones más comunes fueron los núcleos simétrico estrecho y en menor medida otras alteraciones como asimétrico estrecho, binucleado/bilobulado, micronucleado/microlobulado multilobulado/multinucleado, núcleo movido, con ángulos de rotación o sin núcleo (Fig. 1). El volumen corpuscular medio (MCV) referente al volumen individual de los eritrocitos se consideró como un predictor para la presencia de morfología nuclear variante (a pesar de que tiene gran variación entre especies), y la HGB no difirió dependiendo de la presencia o ausencia de deformaciones nucleares. Una ligera baja proporción de eritrocitos con morfología nuclear variante es normal entre los individuos de una población, pero el número de eritrocitos con deformidades se eleva con la presencia de agentes tóxicos como metales pesados (Moreira *et al.*, 2017).

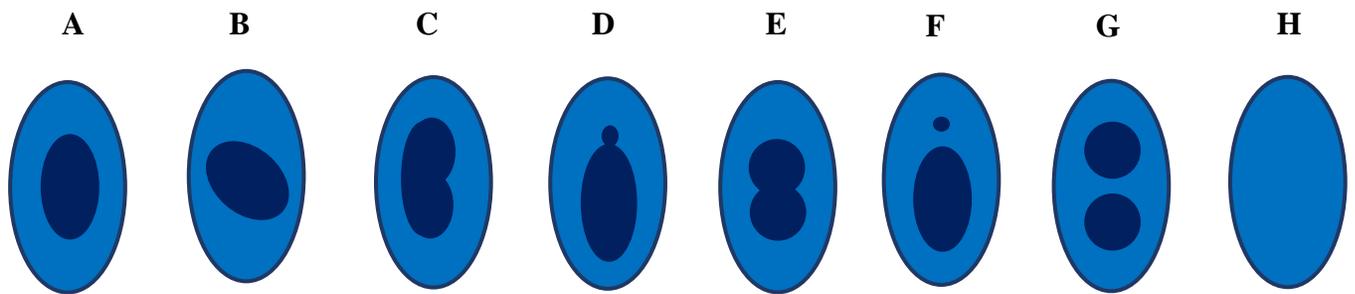


Figura 1. Representación de morfología nuclear variante en eritrocitos aviares. (A) Núcleo normal; (B) Núcleo movido o rotado; (C) Núcleo sangrado; (D) Núcleo estrecho asimétrico; (E) Núcleo estrecho simétrico; (F) Micronúcleo; (G) Binucleado; (H) Anucleado. Clasificación basada en "A pioneering Study on Cytotoxicity In Australian Parakeets (*Melopsittacus undulates*) Exposed To Tannery Effluent (Moreira *et al.*, 2017).

La exposición crónica a contaminantes puede generar efectos genotóxicos, es decir, se inducen cambios en el material genético, ya sea en su estructura o en su número. Un indicador de daño genotóxico es la presencia de micronúcleos, fragmentos pequeños de contenido nuclear que se observan en el citoplasma que se forman cuando las células sufren un daño en el núcleo o una división incompleta (Moreira *et al.*, 2017). Por esto, los eritrocitos con micronúcleos, se pueden considerar como biomarcadores en etapa temprana de genotoxicidad. La presencia de más de 5% (10 micronúcleos en un recuento de 200 eritrocitos) se considera un indicativo para una alteración patológica del ADN como lo demuestran Abosedo y colaboradores en un estudio de 2014. Evaluaron 30 individuos de *Ploceus cucullatus* (tejedor común), de los cuales el 20% eran positivos para micronúcleos. Comparando con individuos que no tenían ningún micronúcleo, estos individuos con micronúcleos tuvieron una serie de parámetros alterados que son indicativos de daño. Particularmente, una reducción en los niveles de HGB, RBC, MCH (cantidad de hemoglobina en eritrocito), HCHC (concentración de hemoglobina eritrocito), elevación en los parámetros de

HCT Y MCV. Además de una reducción en los niveles de leucocitos, plaquetas y heterofilos, y daños histológicos en intestino, hígado, riñones y pulmones.

Las alteraciones en la morfología del citoplasma de los eritrocitos también pueden indicar daño en la salud de las aves. Los poiquilocitos son eritrocitos que, en lugar de tener la forma ovoide común, presentan extremos alargados, que muestra defectos metabólicos y el aumento de la eritropoyesis. Otra malformación del citoplasma son los eritrocitos en forma de lágrima, que son indicadores de toxicosis, y eritrocitos asimétricos (Samour, 2005) (Fig. 2).

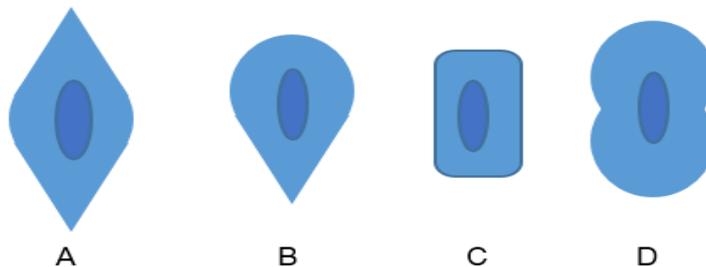


Figura 2. Representación de eritrocitos con morfología variante de citoplasma. (A) poiquilocitos; (B) eritrocitos en forma de lagrima; (C, D) eritrocitos asimétricos. Clasificación basada en descripciones y fotografías de Samour, 2015, Rodak, 2005 y análisis pilotos en este estudio.

Otro caso de contaminación por metales pesados se reportó en la especie *Parus major* (carbonero común) en Bélgica en donde se midió el daño hematológico a diferentes distancias de la fuente de contaminación y concentraciones de metales en sangre y plumas, lo que indicó que el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) eran los metales con mayor presencia en los organismos (Geens *et al.*, 2010). El RBC no difirió entre sitios, pero en los sitios en donde la contaminación por los metales era mayor, los parámetros de HGB, HCT, VCM y MCH eran menores (los valores bajos de VCM y MCH pueden indicar una anemia microcítica). En este estudio, también encontraron una relación negativa entre las concentraciones de plomo en sangre y concentración de hemoglobina, HTC y VCM, lo cual se debe a que el plomo inhibe la enzima δ aminolevulina ácido deshidratasa (Geens *et al.*, 2010). En este estudio, hubo una correlación positiva entre los niveles de plomo y cadmio, y no encontraron diferencias significativas entre las medidas físicas (tarso, longitud, masa corporal) entre los sitios al igual que la edad y el sexo no presentaron un efecto significativo en los parámetros medidos. La cantidad de contaminantes que ingieren estas aves por medio de la dieta es elevada y los efectos a nivel hematológico ocurren casi de manera inmediata a comparación con los niveles de metales en

las plumas, que no mostraron diferencias significativas. Por tanto, un marcador hematológico tiene relevancia cuando los efectos aún son sutiles y no han generado un cambio más notorio como lo serian diferencias fenotípicas. Es apropiado en estos casos utilizar marcadores no destructivos como son las características hematológicas, ya que estas reflejan el impacto sobre los animales expuestos, haciéndolo un método efectivo que funciona como señal de alerta temprana de la contaminación en el estado fisiológico y en la salud de los individuos sin necesidad de sacrificar animales (Geens *et al.*, 2010). Con estos datos se demuestra que los niveles de metales en los organismos y los efectos de la contaminación no son lo mismo; por lo tanto, los niveles de contaminación por sí solos no dan toda la información necesaria para observar el grado de estrés al que están sometidos los organismos en constante contacto con zonas perturbadas (Geens *et al.*, 2010).

El estado hematológico es importante para la supervivencia de las aves (Geens *et al.*, 2010). Los parámetros hematológicos normales están relacionados con la capacidad de crianza de las aves, la cantidad de hemoglobina es importante para la supervivencia de los pichones, pues influye desde su eclosión hasta el emplumado. Los niveles bajos del hematocrito están relacionados con condiciones corporales bajas, esto afecta a la actividad aeróbica y por tanto al vuelo, los niveles en los leucocitos también se ven afectados lo que debilita el sistema inmunológico, dando lugar a una mayor prevalencia de hemoparásitos (Geens *et al.*, 2010).

Hemoparásitos en aves

Los hemoparásitos son organismos que se encuentran típicamente en el torrente sanguíneo de un hospedero durante al menos una de las etapas de su desarrollo y son transmitidos a través de vectores. Los parásitos frecuentemente encontrados en aves son: *Haemoproteus* sp., *Leucocitozoon* sp., *Plasmodium* sp., los géneros *Trypanosoma*, *Bebesia*, *Atoxoplasma*, *Hepatozoon* y microfilarias (etapas larvianas de nemátodos) (Hauptmanová *et al.*, 2006) (Fig. 3). Estos parásitos son un grupo heterogéneo que se encuentra ampliamente distribuido geográficamente, y sus prevalencias difieren de acuerdo a las regiones estudiadas dado que influyen diversos factores para que puedan diseminarse. Esto dependiendo de si los hospederos son buenos o malos reservorios, su resistencia a hemoparásitos y la exposición a los vectores, lo cual depende de actividades diarias, comportamiento de alimentación, selección de los sitios de anidación y descanso de las especies hospederas, edad, eventos estresantes, estado físico y factores genéticos, al igual que la genética y virulencia de los parásitos (González, 2015). Los hemoparásitos eventualmente causan problemas en la salud del hospedero. *Haemoproteus* sp. (que causa pseudomalaria aviar) disminuye la supervivencia de aves silvestres y afecta la actividad reproductiva, y *Plasmodium relictum* (malaria aviar)

afecta la eclosión y el emplumaje de los polluelos, causando decline de especies de aves (González, 2015). Las microfilarias no siempre generan síntomas aparentemente perjudiciales, aunque en diversas especies pueden ser altamente patógenas si causan inflamación crónica de las paredes arteriales pulmonares, producen hemorragia e inflamación miocárdial, necrosis y fibrosis, que causa pérdida de plumas en cabeza, cuello, espalda y alas (González, 2015). Las aves parasitadas pueden presentar signos de anemia, disminución en el peso corporal o alteraciones en el sistema inmunológico. En aves silvestres se han realizado diversos estudios en donde se observa la prevalencia de parásitos. Por ejemplo, en una muestra de 595 individuos, se encontró la siguiente prevalencia: *Haemoproteus* 21%, *Leucocytozoon* 6% y *Plasmodium* 0.5% (Hauptmanová *et al.*, 2006). En este mismo estudio, en una muestra de 289 individuos las prevalencias *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* y *Trypanosoma* fueron 17%, 0.7% y 0.3%, respectivamente. Un estudio realizado con *Zonotrichia capensis* (gorrión chingolo) evaluó la intensidad y prevalencia parasitaria de *Haemoproteus* y *Plasmodium* por medio de análisis molecular (204 muestras) y microscopía óptica (119 muestras), obteniendo 74.72% de prevalencia parasitaria con ambas técnicas (Cadena-Ortiz *et al.*, 2018). En este estudio, se encontró que la proporción de individuos parasitados era mayor entre adultos (80.6%) que la a que en individuos jóvenes (47.2%). Sin embargo, entre los infectados, la intensidad fue menor en adultos que en juveniles y los individuos con mayor grasa corporal presentaron menor intensidad parasitaria independientemente de su edad. Con los resultados de este estudio, se sugirió que en los individuos juveniles la cantidad de grasa sí fue un factor que influyó en la intensidad parasitaria y no así en los adultos.

La contaminación es un evento estresante para los hospederos, pero también puede serlo para los parásitos, por lo que es un factor que también puede afectar la relación entre los hemoparásitos y sus hospederos (Gutiérrez, 2015). Un estudio realizado en 2017 por Ruiz García en San Luis Potosí muestra la relación que tienen los contaminantes agrícolas (organoclorados) con los parásitos en tres familias de aves ampliamente distribuidas en la zona: Cardinalidae, Columbidae, Fringilidae. La prevalencia y la intensidad parasitaria fue mayor en sitios con menor presencia de contaminantes y disminuyó a medida que los contaminantes aumentaron, posiblemente porque los parásitos son perjudicados por los contaminantes.

En Morelos son pocos los estudios que se han realizado para determinar la presencia y la diversidad de hemoparásitos en aves silvestres que habitan en la Sierra de Huautla. En 2015, González evaluó la presencia de hemoparásitos en esta zona comparando 3 sitios diferentes (perturbado, agrícola y conservado) en temporada seca y de lluvias, analizando 142 aves que abarcaban 24 géneros de 33 especies, de los cuales el 28.8% de los individuos presentaron hemoparásitos. La frecuencia de parásitos fue: *Haemoproteus* 28.2%, *Plasmodium* 2.1% y microfilarias 4.9% sin presentar diferencias significativas entre temporadas o

entre sitios de captura. Sin embargo, la diversidad de aves y hemoparásitos fue mayor en el área conservada, lo que se interpretó como un efecto de dilución ya que se encontró una distribución de los parásitos más uniforme entre los individuos. En el caso de la zona perturbada, las aves presentaron una probabilidad menor de infectarse; en este sitio el número de individuos parasitados era menor, pero sufrían una mayor intensidad parasitaria. En el mismo estudio, todos los individuos colectados en Sierra de Huautla de las especies *Thryophilus pleurostictus* (saltapared barrado) e *Icterus pustulatus* estaban infectados. Estas tuvieron una alta intensidad de infección y una hembra de *I. pustulatus*, mostró un daño corporal y plumas en mal estado, que podría ser debido a daños por los hemoparásitos.

Efectos asociados a los metales pesados

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) señala las diez sustancias químicas que constituyen una preocupación para la salud pública. Estas incluyen el arsénico, el mercurio, el cadmio, y el plomo. El arsénico inorgánico produce arsenicosis (intoxicación crónica), y el mercurio tiene efectos teratógenos y daños en los primeros años de vida. El cadmio daña los riñones, el sistema óseo y el respiratorio, y está clasificado como carcinógeno para humanos; una vez dentro del organismo, interactúa con los transportadores de membrana e interfiere en las vías de señalización de los neurotransmisores (Costa *et al.*, 2004). El plomo causa diversos problemas de salud; se acumula en huesos, hígado, riñón y cerebro, y se han demostrado efectos hematológicos, deficiencia de hierro, disminución en el tiempo de vida de los eritrocitos y efectos en la síntesis de hemoglobina (Nava-Ruiz, 2011). Además, el plomo inhibe la enzima δ aminolevulina ácido deshidratasa, que es la encargada de catalizar el segundo paso en la porfirina y la vía biosintética del hemo. El plomo presente en la sangre reemplaza al zinc, que es esencial para el buen funcionamiento de la enzima antes mencionada, influyendo negativamente en la producción de hemoglobina (Geens *et al.*, 2010). Del cadmio y el plomo no se conoce ningún aporte en la bioquímica ni en la fisiología humana y normalmente no se presenta en seres vivos, por lo que una ingesta, por mínima que sea, puede resultar perjudicial sobre todo por la acumulación en el organismo. Un perfil hematológico es indispensable para medir los daños causados por los metales pesados.

Elementos como plomo, cadmio, arsénico pueden quedar en contacto con el ambiente y contaminar el suelo y las plantas que posteriormente lo acumulan en sus células. Los animales se ven afectados ya sea por exposición oral al ingerir organismos o agua contaminada, o por inhalación de partículas. El daño en los organismos va a depender del tiempo, el nivel de exposición a la que estén sometidos y la susceptibilidad de los individuos (Peplow, 1999).

Minería en México

México es un país de gran importancia minera debido a sus exportaciones, sobre todo de minerales metálicos; todo el territorio cuenta con gran cantidad de yacimientos mineros, con alrededor de 29,746 ha de superficie concesionadas a dicha actividad (INEGI, 2014). Esta superficie equivale al 0.015% de la superficie continental del país. México es uno de los principales productores de plata (Ag), aporta el 25% del volumen de la producción a nivel mundial, además del 6% de zinc (Zn) y cadmio (Cd); 5% de plomo (Pb) y cobre (Cu); oro (Au) y azufre (S) en menor cantidad (SIAM, 2016). Como consecuencia de esta actividad, se generan una gran cantidad de metales pesados como residuos. Se denominan como “metales pesados” a los elementos metálicos con una relativa alta densidad, y la mayoría son tóxicos aún en muy bajas concentraciones. Esto incluye al cromo (Cr), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), arsénico (As), plata (Ag), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), y los elementos del grupo del platino (EGP): rutenio (Ru), rodio (Rh), paladio (Pd), osmio (Os), iridio (Ir) y platino (Pt) (Duruibe *et al.*, 2007).

Durante las operaciones primarias de separación y concentración de minerales se generan residuos sólidos denominados jales, los cuales son regulados por las Normas Oficiales Mexicanas NOM-157-SEMARNAT-2009, NOM-141-SEMARNAT-2003, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 y NOM-155-SEMARNAT-2007. Estas normas establecen planes de manejo de residuos mineros, los procedimientos de caracterización, operación y post-operación de los jales, los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados, los requisitos de protección ambiental para sistemas de lixiviados de oro y plata. A pesar de la regulación que se tiene con los materiales de desecho, estos quedan en contacto con el ambiente y pueden ser transportados por el viento o por corrientes de agua, generando problemas ambientales (Duruibe *et al.*, 2007).

El estado de Morelos cuenta con 69 concesiones mineras (2016), que representa el 26.28 de la superficie del estado. Estas minas son principalmente de minerales No Metálicos. En el sur de Morelos se encuentra un distrito minero localizado en Huautla (SGM, 1016), y éste se encuentra dentro del área designada como Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH). La explotación de este distrito minero comenzó a finales del siglo XVIII y siguió hasta que la última minera abandonó el sitio en 1993. A pesar de no ser activa actualmente, las actividades que se realizaron en el distrito minero de Huautla años atrás, dejaron cerca de 780 mil toneladas de residuos tóxicos (Velasco-Trejo, 2004). Se sabe que los contaminantes por la minería metálica siguen presentes por cientos de años después de que las minas cesen con sus actividades (SGM, 2016; Peplow, 1999). En el sitio de Huautla en particular, se ha demostrado en ratones y

en humanos residentes cerca de estos residuos tóxicos están expuestos a contaminantes y tienen niveles elevados de metales pesados en los tejidos (Tovar-Sánchez, *et al.*, 2012; 2016).

Una de las fuentes de variaciones en las características hematológicas es la exposición a contaminantes, al igual que parámetros de cada especie como el uso de hábitat, la historia de vida, la dieta, entre otros factores. Por lo tanto, es importante conocer los estados basales para establecer valores de referencia con los que se pueda comparar sitios perturbados (Samour, 2005). Gracias a que las aves son fáciles de observar y monitorear, comúnmente son utilizadas como un grupo modelo para estudios biológicos en general, para señalar regiones perturbadas, conservación de especies silvestres y como indicadores del potencial de la biodiversidad (Ramírez-Albores y Ramírez-Cedillo, 2002). *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* son especies que difieren en coloración, hábitos, y dieta, pero comparten diversas características, siendo ambas del mismo orden (Paseriformes) y familia (Icteridae), conocidos comúnmente como tordos, caciques, calandrias y zanates. Ambas son residentes territoriales, pasando gran parte de su vida en una misma zona (Gaviño de la Torre, 2015). *M. aeneus* es una especie conocida por realizar parasitismo de nido y frecuentemente parasita el cuidado parental de *I. pustulatus* (Ramírez-Albores y Ramírez-Cedillo, 2002).

Con las características hematológicas, principalmente la variación morfológica nuclear de los eritrocitos, de estas dos especies podemos conocer el estado de salud de las aves que habitan cerca de zonas contaminadas por desechos mineros y zonas sin contaminantes. Con lo cual podemos, por un lado, marcar los valores base de especies que se encuentran en estado silvestre dentro del estado de Morelos y por otro, evaluar el posible efecto de la cercanía a desechos mineros.

II. JUSTIFICACIÓN

Los estudios hematológicos son de gran utilidad debido a que funcionan como una señal de alerta temprana del estado de salud de los individuos. Por ejemplo, el estado basal hematológico varía entre especies dependiendo de sus hábitos, dieta, historia de vida y otros factores desconocidos en especies silvestres. Diferentes contaminantes pueden provocar cambios visibles en los valores hematológicos basales antes que se note en el aspecto físico de los individuos. Por lo tanto, estos valores han sido utilizados como indicadores de posibles efectos tóxicos en el estado fisiológico de los organismos, como la presencia de una gran cantidad de micronúcleos en los eritrocitos de aves, reptiles y peces (Samour, 2005; Geens *et al.*, 2010; Abosedo *et al.*, 2014; Clark, 2015; Moreira *et al.*, 2017). Las alteraciones morfológicas nucleares de los eritrocitos aviáres se han estudiado en cautiverio (Moreira, *et al.*, 2017), pero los referentes en vida silvestre son poco estudiados. Por lo que, si conocemos los niveles base dentro de una población, podemos evaluar potenciales efectos de variables como la contaminación, y algunas de sus consecuencias. Por ejemplo, los contaminantes debilitan el sistema inmunitario de los individuos, y se predice una alta prevalencia de hemoparásitos (Hauptmanová, 2006).

Molothrus aeneus e *Icterus pustulatus* son aves comunes residentes de la zona con diferentes hábitos tanto alimenticios como de comportamiento en el uso de hábitat (Gaviño de la Torre, 2015). Por lo tanto, resulta interesante por un lado caracterizar las potenciales diferencias basales en las alteraciones morfológicas nucleares en los eritrocitos de cada especie y, por otro lado, evaluar si hay un aumento en las tasas de alteraciones en zonas con diferentes niveles de exposición a metales pesados provenientes de los jales en la Sierra de Huautla. En este estudio planteamos un diseño de colecta de tejido en las aves en un gradiente de distancia a las fuentes principales, (por la cantidad de desechos), de contaminación que son dos sitios en los jales de Huautla y de Rancho Viejo. Además, un tercer sitio río abajo a 2.76 km de distancia, en donde corren los lixiviados de estos jales. Finalmente, un cuarto sitio, control río arriba a 8.31 km de distancia de los jales (Ver adelante Figura 3 y el diseño experimental).

La zona de estudio se encuentra dentro y en las inmediaciones de la Reserva de la Biósfera de la Sierra de Huautla. Esta cuenta con gran diversidad de aves, ya que representa el 49.03% de la avifauna del estado de Morelos (Ramírez-Albores y Ramírez-Cedillo, 2002). Por lo tanto, es de gran importancia conocer el estado de salud de las aves de la zona con técnicas no destructivas. Además, al establecer valores hematológicos basales para las especies de estudio, que son abundantes y de amplia distribución, podrían ser utilizados como organismos modelo en otros sitios.

III. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

H₁: Alteraciones hematológicas: La tasa de alteraciones en la morfología nuclear y citoplasmática de los eritrocitos será diferente en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*, debido a que depende de las diferencias inter-específicas en la ocupación del hábitat, y la dieta.

P₁. Los individuos de ambas especies mostrarán diferencias en:

- a) Índice de alteraciones morfológicas nucleares (micronúcleos, binucleados, multinucleados, con núcleo estrecho simétrico, estrecho asimétrico) en proporción del total de eritrocitos con membrana intacta.
- b) Índice de malformaciones en la morfología del citoplasma de los eritrocitos (irregulares, poiquilocitos, en forma de gota) expresado en la proporción total de eritrocitos con membrana intacta.
- c) Índice de policromacia, proporción de eritrocitos policromáticos (estado inmaduro) en el conteo total de eritrocitos con membrana intacta.

H₂: Hemoparásitos: La tasa de hemoparásitos será diferente en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*, debido a que depende de las diferencias inter-específicas en la ocupación del hábitat, y la dieta.

P₂. Los individuos de ambas especies mostrarán diferencias en:

prevalencia (presencia de al menos un eritrocito infectado), e intensidad (número de eritrocitos infectados/ total de eritrocitos con membrana intacta) de infección con los hemoparásitos: *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Microfilaria*.

H₃: Diferencias entre sitios: La exposición a los desechos tóxicos mineros aumentará la tasa de alteraciones hematológicas y en la prevalencia de hemoparásitos

P₃. Esperamos que los individuos de los sitios más cercanos a los sitios contaminados y río abajo de los jales expresaran los efectos descritos en P1 y P2 con mayor intensidad que los individuos del sitio control río arriba.

IV. OBJETIVOS

General

- 1 Caracterizar la morfología nuclear y citoplasmática variante en los eritrocitos y la prevalencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* para calcular índices de hematocrito, genotoxicidad, policromacia y hemoparásitos.
- 2 Evaluar si estos índices difieren entre los sitios de estudio.

Objetivos Particulares

Para el objetivo 1

- Calcular el hematocrito.
- Identificar las alteraciones morfológicas nucleares de los eritrocitos.
- Cuantificar las alteraciones morfológicas del citoplasma de los eritrocitos.
- Cuantificar el índice de policromacia.
- Calcular la prevalencia e intensidad de eritrocitos infectados por hemoparásitos.
- Evaluar si difieren estas características hematológicas entre las dos especies.

Para el objetivo 2

- Evaluar si las características hematológicas difieren entre sitios con respecto a su cercanía a los desechos mineros.
 - Evaluar los efectos causados por la cercanía a contaminantes mineros en *Icterus pustulatus* en comparación con los efectos causados en *Molothrus aeneus*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Sitio de estudio

La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) es una zona de selva baja caducifolia. Está se ubica principalmente en el sur del estado de Morelos (con una menor área en los estados de Puebla y Guerrero), con altitud de 700 a 2400 msnm donde predomina el clima cálido semihúmedo con lluvias en verano (CONABIO 2002). Se muestreó en 4 sitios con condiciones climáticas y de vegetación similares (Fig. 3). Dos sitios con la principal fuente de contaminación que son el jal de Huautla (JH; 18.440097° N, 99.032090° O) y el jal de Rancho Viejo (JRV; 18.4359175° N, 99.022905° O) teniendo entre si una distancia de 1.07 km. Un sitio intermedio río abajo del afluente del Río Rancho Viejo (RRV; 18.422676° N, 99.013260° O). En este sitio no hay jales, pero recibe sedimentos contaminados pues se encuentra a 2.76 km río abajo de los jales. Finalmente, un sitio control, en el río Quilamula (QM; 18.512921° N, 99.014515° O). El sitio control se localiza río arriba a 8.31 km de los jales. Considerando la distancia entre los sitios de muestreo, y la conducta territorial durante todo el año de las especies de estudio, existe una baja probabilidad de que los individuos se muevan entre sitios. Por lo que los sitios son independientes. Además, en este estudio no se presentaron re-capturas entre sitios, pero si hubo recapturas intra-sitio.

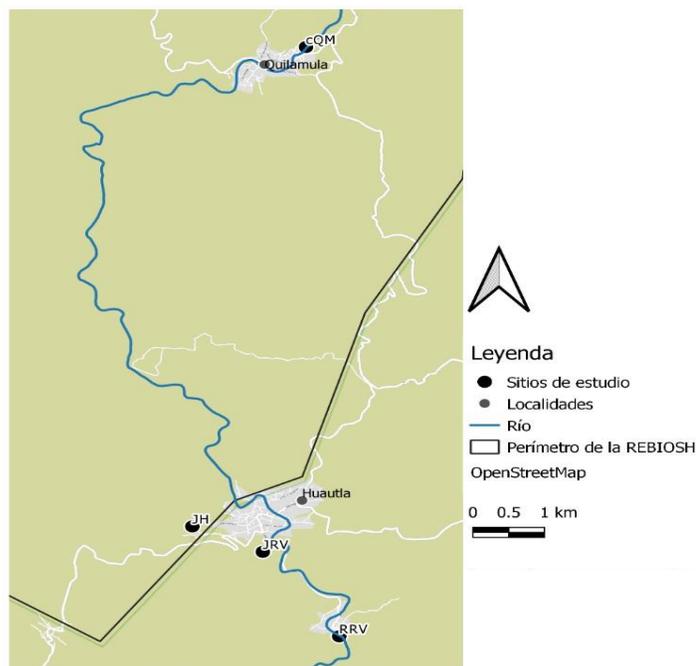


Figura 3: Ubicación geográfica de área de estudio con puntos de muestreo. JH: Jal de Huautla, JRV: Jal de Rancho Viejo, RRV: Río Rancho Viejo, CQM: Río Quilamula (control). Dentro de Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Morelos.

V.2 Especies de estudio

En el orden Paseriformes se encuentra la familia Icteridae que está distribuida en toda América. Particularmente en México, esta familia está ampliamente distribuida, al igual que en el estado de Morelos (Gaviño de la Torre, 2015). En la Sierra de Huautla se encuentran registradas 10 especies de Icteridae (Ramírez-Albores y Ramírez-Cedillo, 2002). Los individuos, generalmente son de tamaño pequeño a mediano con un pico robusto y puntiagudo. La mayoría de las especies de esta familia presentan un dimorfismo sexual muy marcado. Cuenta con una gran variedad de colores desde el plumaje completamente negro hasta colores amarillos, naranjas o rojos sumamente llamativos (Gaviño de la Torre, 2015). Las especies de estudio difieren en coloración como en hábitos alimenticios y espaciales, pero presentan una estrecha relación debido a que *Molothrus aeneus* parasita el cuidado parental de *Icterus pustulatus*.

Icterus pustulatus es conocida como calandria dorso rayado o calandria de fuego. La información sobre la historia natural de la especie ofrecida en este estudio se basó en la obra de Gaviño de la Torre (2015). La especie se distribuye en zonas tropicales y subtropicales en altitudes desde el nivel del mar hasta 2000 msnm. Los individuos se alimentan de insectos, frutos, néctar y semillas. Estas aves, son extremadamente territoriales, con un tamaño de territorio aproximado de 800 m². La época reproductiva ocurre entre mayo y agosto. El nido lo construyen las hembras tejiendo una estructura colgante de fibras de plantas y estas ponen de 3 a 5 huevos. Los individuos tienen el plumaje de la espalda con rayas en colores naranjas y negros. Ambos sexos son de colores llamativos; el macho cuenta con una corona oscura, los lados de la cabeza y el cuello son de color rojo naranja, un tono negro en las alas, garganta y cola; pico negro con la base azulada; iris café oscuro y patas azuladas. La hembra presenta una coloración similar al macho, pero con colores menos brillantes, cola negra con las plumas de la cola color oliva y la punta blanca.

Molothrus aeneus conocida como tordo de ojo rojo. La información sobre la historia natural de la especie ofrecida en este estudio se basó en la obra de Gaviño de la Torre (2015). La especie se distribuye en zonas tropicales y subtropicales, en altitudes desde el nivel del mar hasta 2200 msnm. Los adultos son casi exclusivamente granívoros, consumen semillas que generalmente se encuentran en pastos o matorrales, también pueden consumir insectos. Las crías solo se alimentan de insectos. La época reproductiva ocurre de abril a finales de junio. El cortejo lo realizan a nivel del suelo; el macho intenta llamar la atención de la hembra erizando su plumaje "aparentando" tener un mayor tamaño. Los individuos de la especie no construyen nidos pues parasitan los nidos de otras especies, con frecuencia nidos de calandrias. Las hembras ponen un huevo por día en los nidos activos de otras especies y varias hembras pueden poner huevo en el mismo nido. Las crías son altriciales y dejan el nido a los 11 días. El macho es negro con reflejos

verdosos, violeta o cafés; el pico es negro, corto y grueso; iris rojo. La hembra es de color negro descolorido o café oscuro: el iris café oscuro; de menor tamaño que el macho. Se observa en bandas numerosas.

En este trabajo se colectó tejido sanguíneo en un tamaño de muestra de 43 *Icterus pustulatus* (31 machos y 12 hembras) y 18 *Molothrus aeneus* (9 machos y 9 hembras). La distribución de esta muestra entre sitios esta detallada en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* en los sitios de muestreo,

Sitio	Sexo	<i>I. Pustulatus</i>	<i>M. aeneus</i>
Jal Huautla	Hembras	5	2
	Machos	8	4
	Total	13	6
Jal Racho Viejo	Hembras	2	6
	Machos	9	1
	Total	11	7
Rio Rancho Viejo	Hembras	4	0
	Machos	6	3
	Total	10	3
Quilamula	Hembras	1	1
	Machos	8	1
	Total	9	2
TOTAL		43	18

V.3 Captura de aves y toma de muestras sanguíneas

Se colocaron redes de niebla (6 y 12m de largo, con paso de malla 36mm) en los puntos de muestreo durante los meses de mayo y junio (transición entre secas y lluvias) alternando los sitios cada día, desde el amanecer (aproximadamente entre 06:30 y 07:00 h) hasta las 13:00 h. Para atraer a los individuos de cada especie se utilizaron grabaciones de conoespecíficos. Las redes fueron constantemente monitoreadas y las aves que eran capturadas se extraían de las redes para ser procesadas de manera inmediata para que sufrieran el menor estrés posible. Se contó con un permiso de colecta científica de SEMARNAT con número: SGPA/DGVS/03032/17.

Los individuos fueron anillados para su identificación individual con anillos de plástico de color y un anillo de aluminio, este anillo contenía un número único para cada individuo. Para obtener el frotis y el hematocrito, de la vena braquial se extrajo una muestra de sangre de hasta 75 μL , dentro del 1% del peso corporal recomendado para no afectar negativamente a los individuos (Samour, 2005). Como parte de otros estudios con los mismo individuos, en cada ave capturada se le tomaron las siguientes variables: longitud de tarso, longitud alar, se calificó la forma y tamaño de los músculos pectorales, se determinó la categoría de edad, el sexo, y caracteres sexuales (parche de incubación en hembras de *Icterus pustulatus* y protuberancia cloacal en machos). También, se tomaron fotografías de cada individuo, y se hizo un breve experimento conductual. Después de la manipulación, cada individuo fue liberado en el mismo sitio de colecta.

V.4 Preparación de muestra y captura de fotografías

Inmediatamente después de extraer la muestra de sangre, se colocó en un portaobjetos una gota ($\sim 1\mu\text{L}$) y se realizaron al menos dos frotis de cada individuo. Los frotis se fijaron con metanol durante diez minutos dentro de las siguientes 6 horas después de la colecta. Los frotis se tiñeron con colorante Wright-Giemsa durante un minuto. Una vez teñido, cada frotis se identificó el de mejor calidad mirando al microscopio a una magnificación de 40x. En cada frotis se localizó una zona en donde los eritrocitos tuvieran una distribución homogénea y sin solapamiento celular. Para esto, se utilizó el objetivo 1000x y aceite de inmersión y moviendo el frotis de manera sistemática para evitar repetición de células. Cada campo elegido se fotografió, por lo que se tuvieron 15 campos independientes por frotis, para obtener alrededor de 2,000-2,500 células disponibles para contabilizar (adaptado de Moreira *et al.*, 2017).

V.5 Análisis sanguíneo

Para la prueba del hematocrito (HCT) se emplearon tubos capilares con la muestra de sangre obtenidas anteriormente. Esta muestra se centrifugo por 10 minutos; luego, con un vernier digital se midió la altura de la muestra completa y la capa de eritrocitos. Se calculó el HCT usando la siguiente fórmula:

$$HCT = \frac{\text{medida capa de eritrocitos}}{\text{medida total del capilar}}$$

Para la cuantificación de eritrocitos, en un mínimo de 1000 células con la membrana intacta, por individuo se determinó: el porcentaje de alteraciones morfológicas nucleares, el porcentaje de malformaciones del citoplasma y el índice de eritrocitos policromáticos. El conteo de eritrocitos se realizó con la ayuda de programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) usando el contador “multipoint”. Las fotografías que se utilizaron se eligieron de manera aleatoria con el programa de Excel (formula: =aleatorio_entre (1, 15)), cuidando que la fotografía contara con la calidad adecuada (si era de mala calidad, se tomó en cuenta la siguiente que se consideró adecuada). Se contaron fotografías completas hasta completar el mínimo de 1000 eritrocitos (con la membrana intacta) contados por individuo. Además de elegir las fotografías al azar, los conteos se hicieron de forma ciega con respecto al sitio donde fue capturado el individuo para evitar cualquier sesgo del observador. Para poder establecer conteos independientes en cada tipo celular se asignaron marcas de colores a cada célula, en donde se utilizó el color amarillo para los eritrocitos maduros normales, color rosa para los eritrocitos maduros anormales, turquesa para los eritrocitos policromáticos normales, verde para los policromáticos anormales y azul para las células que no fueron contadas (ej. por estar cortadas por la orilla de la fotografía o por estar lisiadas) (Fig. 4a). Para fines prácticos del programa Fiji, las anormalidades nucleares y del citoplasma, así como la presencia de hemoparásitos se consideraron en las células anormales, y estas fueron marcadas de color rosa o verde dependiendo de si eran eritrocitos maduros o policromáticos. Se llenó una hoja de registro con la información de cada individuo, observador, fecha en la que se realizó el conteo, número de fotografías que se utilizaron, y en dichas hojas se hacían las distinciones en cuanto a las anormalidades que presentaban cada eritrocito (Fig. 4b). En este estudio, se cuenta también con una base de Excel en donde se tienen los datos de cada fotografía, tomando en cuenta los totales de cada individuo y de cada categoría marcada en el contador Fiji.

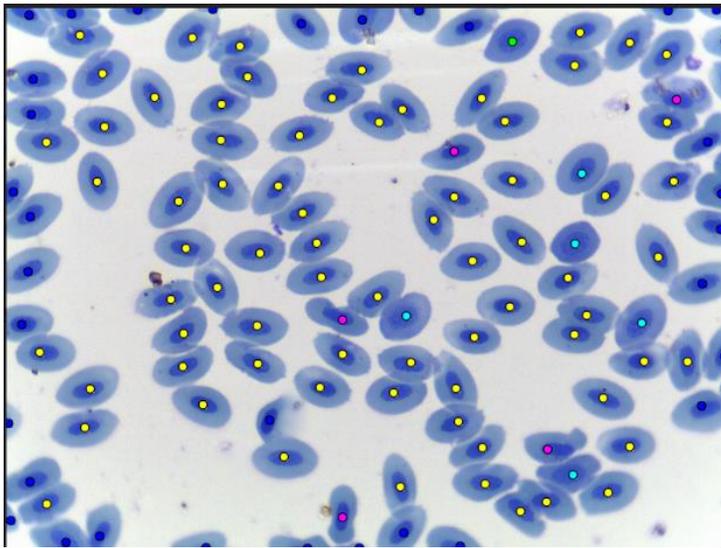


Figura 4a. Células marcadas con el programa Fiji. Amarillos: eritrocitos maduros normales, Rosa: eritrocitos maduros anormales, Turquesa: eritrocitos policromáticos normales, verde: eritrocitos policromáticos anormales, azul: células no contadas.

Individuo: _____	Fotos: _____	Observador: _____	Fecha: _____			
	Normal 	Poikilocitos (deformes) 	Aglobado (células "D") 			
	Maduros					
→ Parasitado?	No	Sí	No	Sí	No	Sí
Normal						
Movido						
Sangrado						
Micronucleo						
Estrecho Asim.						
Binucleado						
Estrecho Sim.						
Anucleado						
	Policromáticos					
Normal						
Movido						
Sangrado						
Micronucleo						
Estrecho Asim.						
Binucleado						
Estrecho Sim.						
Anucleado						
TOTAL CONTADO:	Maduros: Normales:		Anormales:			
	Policromáticos: Normales:		Anormales:			

Figura 4b. Hoja de registro para el conteo celular de cada individuo, con división por categorías.

Los conteos de llevaron a cabo de manera conjunta entre dos observadores por lo que antes de iniciar la colecta de datos de conteos, se hicieron ejercicios de repetibilidad para lograr una confiabilidad inter-observador del 95% en la clasificación de las células. Además, se realizaron cálculos de confiabilidad intra-observador contando la misma foto una segunda vez para una submuestra de las fotos para confirmar que se hayan mantenido constantes los criterios a través del tiempo.

En la cuantificación de hemoparásitos se tomó en cuenta la prevalencia de parásitos si en el conteo se observó al menos un parásito. Para la prevalencia de *Haemoproteus* se contabilizaron los eritrocitos infectados en el conteo que se realizó para cuantificación de eritrocitos. En el caso de la intensidad de hemoparásitos se realizó un conteo de 1000 eritrocitos con membrana intacta para detectar la cantidad de células parasitadas aplicando la siguiente fórmula. Para la presencia de *Microfilaria*, se realizó un barrido en todo el frotis, desplazando la laminilla de forma sistemática, posterior al conteo de células por el frotis.

La fórmula que se utilizó para obtener la intensidad parasitaria fue:

$$intensidad\ parasitaria = \frac{eritrocitos\ infectados}{total\ de\ eritrocitos}$$

V.6 Análisis de datos

El análisis se realizó con ayuda del programa R (R Core Team, 2019). La inspección visual de los histogramas de cada variable sugirió que no se conformaban con una distribución normal, por lo que se procedió a realizar pruebas estadísticas no paramétricas. Para la comparación entre especies (dos grupos) se realizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Para la comparación entre sitios (cuatro grupos) se utilizó un ANOVA Kruskal-Wallis. El nivel de significancia considerado fue de $P \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

VI.1 Hematocrito

Se calculó el hematocrito para los individuos de los cuales se logró obtener una muestra de sangre suficiente (15 *Molothrus aeneus* y 34 *Icterus pustulatus*). El valor del HCT se encuentra dentro de un rango que va desde los 0.40 a los 0.75. La mayoría de los individuos se encuentran alrededor de 0.50, que es considerado un valor normal para aves silvestres (Fig. 5). Ninguno muestra un valor por debajo de los 0.35, que sería indicativo de anemia (Campbell, 2015).

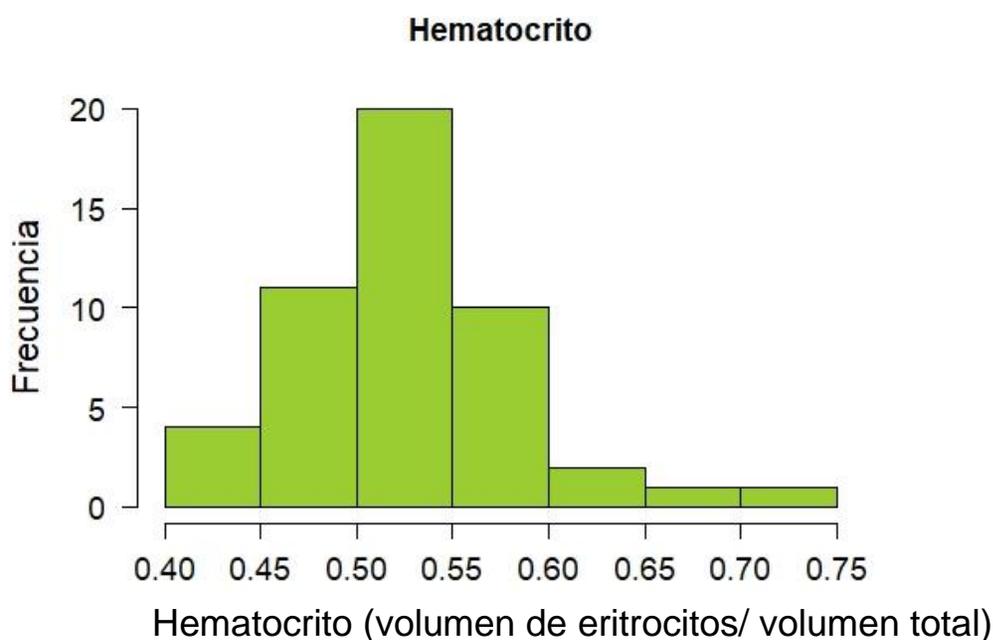


Figura 5: Distribución de valores de Hematocrito en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* en Huautla, Morelos.

No se encontraron diferencias en el hematocrito entre especies ($P= 0.3509$) ni entre sitios dentro de cada especie (*I. pustulatus*: $P=0.11138$, *M. aeneus*: $P=0.3055$).

VI. 2 Caracterización y conteo de eritrocitos normales y anormales

En ambas especies se encontraron tanto células maduras como policromáticas normales y con anomalías, sin embargo, los tipos y combinaciones de malformaciones difirieron entre especies. Las diferencias de cada especie están ilustradas en la figura 6.

Tomando en cuenta los eritrocitos tanto maduros como policromáticos, las dos especies comparten 17 categorías, 12 de las cuales solo se encontraron en *I. pustulatus* y solo 2 se encontraron solo en *M. aeneus*. En eritrocitos maduros con membrana completamente normal, se encontraron todas las variaciones morfológicas nucleares en *I. pustulatus*, y 16 de las categorías de anomalías (ya sea en citoplasma, núcleo, o presencia de parásitos) en células maduras se encontraron en *I. pustulatus*. De estas mismas 11 se encontraban presentes en ambas especies. *M. aeneus* cuenta con menor representación de eritrocitos maduros parasitados, con solo un apartado con esta descripción.

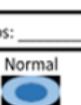
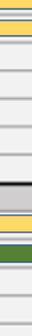
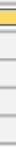
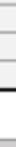
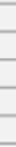
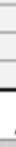
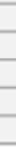
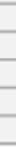
Individuo: _____ Fotos: _____ Observador: _____ Fecha: _____		Normal		Poikilocitos (deformes)		Aglobado (células "D")	
							
		Maduros					
→ Parasitado?		No	Sí	No	Sí	No	Sí
	Normal						
	Movido						
	Sangrado						
	Micronucleo						
	Estrecho Asim.						
	Binucleado						
	Estrecho Sim.						
	Anucleado						
		Policromáticos					
	Normal						
	Movido						
	Sangrado						
	Micronucleo						
	Estrecho Asim.						
	Binucleado						
	Estrecho Sim.						
	Anucleado						
TOTAL CONTADO:		Maduros: Normales: _____ Anormales: _____		Policromáticos: Normales: _____ Anormales: _____			

Figura 6: Desglose de categorías en eritrocitos con morfología variante detectadas al menos una vez en cada especie. Celdas con color amarillo indican subcategorías con representación solo en *Icterus pustulatus*, en verde oscuro solo para *Molothrus aeneus* y verde claro para ambas especies.

En ambas especies había subcategorías con valores muy bajos que no permiten el análisis individual de cada una, por lo que se hicieron las siguientes agrupaciones de malformaciones similares (Fig. 7).

- **Maduro Movido:** Suma de eritrocitos maduros de citoplasma normal con el núcleo movido, eritrocitos maduros poikilocitos con el núcleo movido, policromáticos normales con núcleo movido y policromáticos poikilocitos con núcleo movido por individuo.

- **Maduro con Hendiduras:** Suma de eritrocitos maduros con citoplasma normal, pero núcleo que presenta un tipo de hendidura sin llegar a una separación completa (Sangrado, estrecho Asimétrico, Estrecho Simétrico) por individuo.
- **Maduro con Núcleo Separado:** Suma de eritrocitos maduros con citoplasma normal, pero con núcleo completamente separado (Micronúcleos, binucleados) por individuo.
- **Maduro poiquilocito:** Eritrocitos maduros con forma asimétrica o puntiaguda (poiquilocitos) con núcleo normal.
 - Se encontró un eritrocito maduro poiquilocito anucleado que se agregó a esta categoría.
 - Se encontró un eritrocito maduro poiquilocito con el núcleo sangrado que se agregó a esta categoría
- **Policromático Anormal:** suma de todos los eritrocitos policromáticos anormales, ya sea en citoplasma o núcleo.
- **Policromático total:** Suma de eritrocitos policromáticos completamente normales y eritrocitos policromáticos anormales (poiquilocitos, aglobados y parasitados)
- **Eritrocito Aglobado:** Suma de eritrocitos maduros aglobados y eritrocitos policromáticos aglobados.
- **Eritrocito Parasitado:** Suma de eritrocitos maduros parasitados y eritrocitos policromáticos parasitados, tanto normales como anormales (Fig. 8).

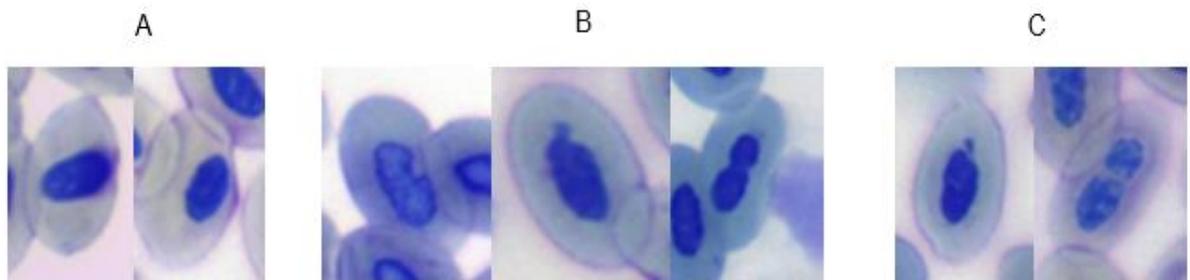


Figura 7: Agrupaciones de eritrocitos de acuerdo a su anomalía en el núcleo. (A) Maduro movido (Eritrocitos con el núcleo rotado y movido); (B) Maduro con hendiduras (Eritrocitos con núcleo sangrado, estrecho asimétrico, estrecho simétrico); (C) Maduros con Núcleo Separado (Micronúcleo, binucleado).

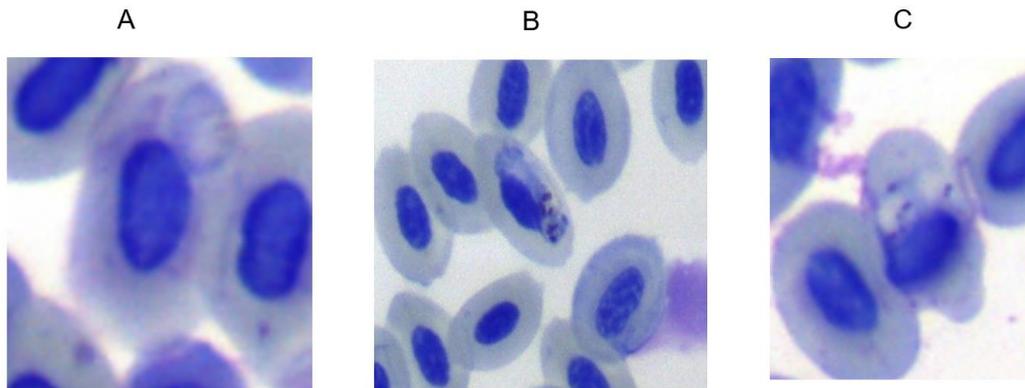


Figura 8: Eritrocitos parasitados. (A) eritrocito policromático parasitado con citoplasma y núcleo normal; (B) eritrocito maduro parasitado, con citoplasma y núcleo normal; (C) eritrocito parasitado con citoplasma anormal y núcleo rotado.

Todas las categorías son mutuamente excluyentes a excepción de “policromáticos totales” que incluye a todas las categorías de policromáticos. Debido a que el conteo total varía entre individuos, el total de cada categoría de anomalía fue dividido entre el total de células contadas antes del análisis. En el conteo de un *I. pustulatus* se encontró un eritrocito maduro con citoplasma normal anucleado que no se tomó en cuenta debido a que fue el único que se detectó y no era compatible con ninguna de las categorías.

Para comparar entre especies, se obtuvieron las medianas y el rango intercuartil de cada categoría en cada especie. En términos generales, *I. pustulatus* tuvo mayor variabilidad (rango total y rango intercuartil más amplio) en los índices de malformación que *M. aeneus* (Tabla 2). Se encontraron diferencias significativas entre especies en la categoría de policromáticos Normales, Eritrocitos Parasitados y Eritrocitos Aglobados (tabla 2).

Tabla 2. Valores de mediana y rango intercuartil (IQR) en *I. pustulatus* y *M. aeneus* y valores de p de la comparación entre las dos especies (prueba de suma de rangos de Wilcoxon).

	<i>Icterus pustulatus</i>		<i>Molothrus aeneus</i>		Ambas especies
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	<i>P</i>
Maduro Normal	2.75×10 ⁻³	3.89×10 ⁻³	2.82×10 ⁻³	2.33×10 ⁻³	0.968
Maduro con Hendidura	5.94×10 ⁻³	7.24×10 ⁻³	5.19×10 ⁻³	0.0115	0.6296
Maduro con Núcleo Separado	0	9.65×10 ⁻⁴	9.26×10 ⁻⁴	9.80×10 ⁻⁴	0.325
Maduro Poiquilocito	6.70×10 ⁻³	9.99×10 ⁻³	4.70×10 ⁻³	5.36×10 ⁻³	0.3189
Policromático Normal	0.0908	0.0439	0.0664	0.0209	7.564×10⁻⁴
Policromático Anormal	0.0217	0.0296	0.0113	0.032	0.394
Eritrocito Parasitado	4.87×10 ⁻³	7.27×10 ⁻³	0	0	2.634×10⁻⁶
Eritrocito Aglobado	9.27×10 ⁻⁴	1.93×10 ⁻³	0	6.88×10 ⁻⁴	0.0106

VI.2.1 Eritrocitos Aglobados

La proporción de eritrocitos aglobados fue significativamente mayor en *I. pustulatus* en comparación con los individuos de *M. aeneus* ($P= 0.0106$) (Fig. 9).

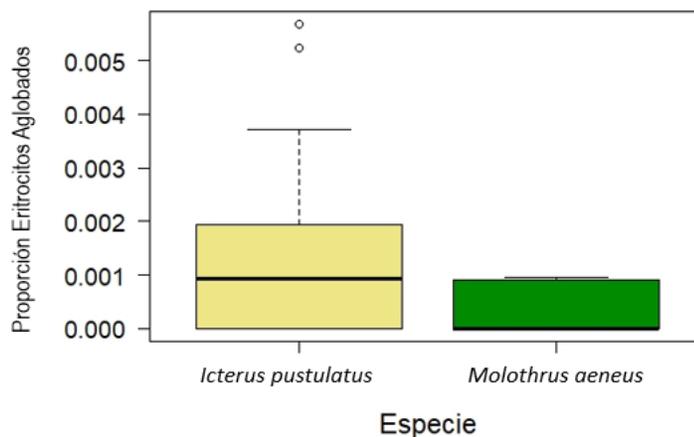


Figura 9. Comparación entre *I. pustulatus* y *Molothrus aeneus* en la proporción de eritrocitos aglobados.

VI.2.2 Eritrocitos Policromáticos Normales

Los rangos en los índices de policromacia para cada especie fueron:

- *I. pustulatus*: 4.85 – 21.89%
- *M. aeneus*: 5.6 – 10.66

En los análisis comparando las especies se encontró una diferencia significativa en los valores de los índices de policromacia ($P= 7.564 \times 10^{-4}$); *I. pustulatus* muestra una mayor proporción de eritrocitos policromáticos a comparación de *M. aeneus* (Fig. 10).

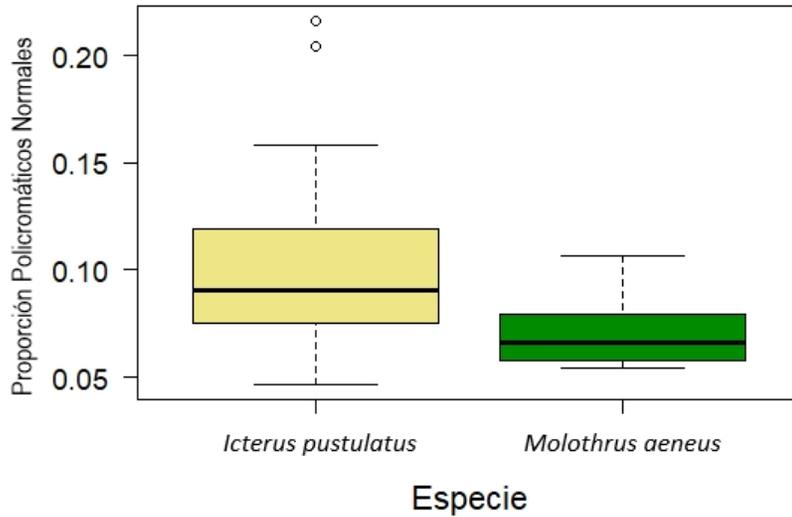


Figura 10. Comparación entre *I. pustulatus* y *Molothrus aeneus* en la proporción de eritrocitos policromáticos.

VI.2.3 Eritrocitos Parasitados

Los rangos en los índices de parasitemia para cada especie fueron:

- *I. pustulatus*: 0 – 2.44%
- *M. aeneus*: 0 – 0.4%

Los individuos que presentaron mayor proporción de eritrocitos parasitados fueron *I. pustulatus*, de Quilamula y Jal Huautla con 22.23% y 22.98% respectivamente.

Se encontró un individuo *I. pustulatus* de Quilamula con presencia de Microfilarias en el barrido de frotis previo al conteo (Fig. 11).

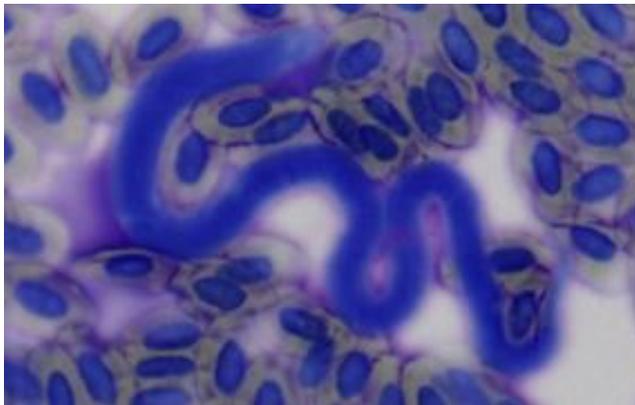


Figura 11. Microfilaria en frotis de sangre de *Icterus pustulatus*.

Los valores para la proporción de eritrocitos parasitados resulto significativa en la comparación entre especies ($P= 2.634 \times 10^{-6}$) en donde *M. aeneus* presenta un menor índice de parasitemia que *I. pustulatus* (Fig. 12).

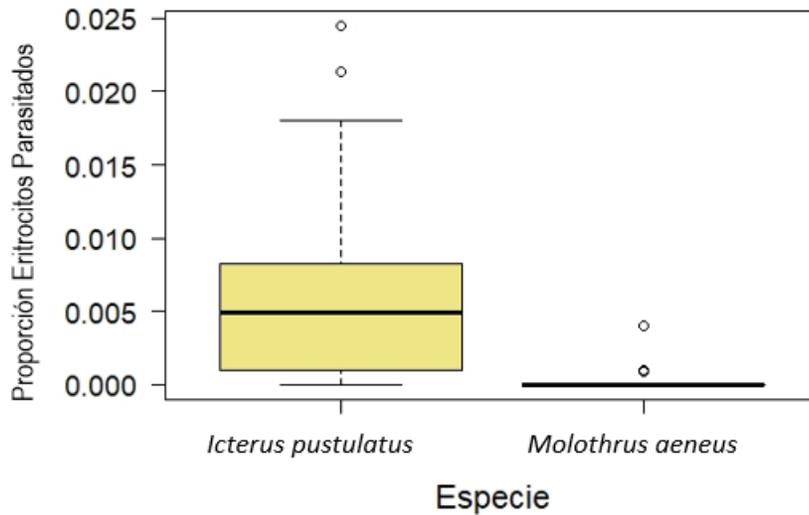


Figura 12. Comparación entre *I. pustulatus* y *Molothrus aeneus* en la proporción de eritrocitos parasitados.

VI. 3 Comparación entre sitios

No encontramos diferencias significativas entre sitios en ninguna de las dos especies en las categorías de morfología nuclear y citoplasmática variante de los eritrocitos, los índices de policromacia y parasitismo, o el hematocrito (tabla 3).

Tabla 3 Valores de P para la comparación de variables de respuesta en categorías de morfología de eritrocitos entre *I. pustulatus* y *M. aeneus*.

VARIABLES DE RESPUESTA	<i>Icterus pustulatus</i>	<i>Molothrus aeneus</i>
%Maduros Movidos	0.147	0.251
%Maduro con Hendidura	0.369	0.892
%Maduro Núcleo Separado	0.428	0.163
%Maduro poiquilocito	0.069	0.295
%Policromático Total	0.743	0.915
%Policromático Anormal	0.124	0.878
%Eritrocitos Parasitados	0.879	0.311
%Eritrocitos Aglobados	0.170	0.375
Hematocrito	0.111	0.306

VII. Discusión

En este estudio se determinaron valores de hematocrito y se caracterizaron alteraciones morfológicas nucleares y citoplasmáticas en eritrocitos, índices de policromacia y parasitemia, y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*, con el fin de determinar valores basales para estas especies en vida libre en el estado de Morelos. Realizamos comparaciones entre estas dos especies y determinamos si estos valores diferían dependiendo de la cercanía a desechos mineros con contenidos elevados de metales pesados. No encontramos diferencias significativas en el hematocrito de *I. pustulatus* y *M. aeneus*, gran parte de los individuos presentaron un rango normal (HCT= 0.50) y ninguno se encontró por debajo del valor indicativo para anemia (HCT= 0.35). En cuanto a las alteraciones morfológicas de los eritrocitos, encontramos diferencias importantes entre especies. Aunque las dos especies comparten la mayoría de las categorías dentro de alteraciones morfológicas del núcleo, *I. pustulatus* cuenta con una mayor diversidad de alteraciones del núcleo en eritrocitos maduros comparado con *M. aeneus*. En eritrocitos con malformaciones citoplasmáticas, ambas especies presentaron un gran número de eritrocitos poiquilocitos maduros. *I. pustulatus* presentó una mayor cantidad de eritrocitos aglobados, al igual que un índice de

policromacia mayor y una mayor variedad de alteraciones nucleares en eritrocitos poiquilocitos policromáticos respecto a *M. aeneus*. El índice de parasitemia y la proporción de eritrocitos parasitados fue significativamente mayor en *I. pustulatus* que en *M. aeneus*. No hay diferencia entre los sitios contaminados y el sitio control en ninguna de las variables.

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre especies en el número de células con alteraciones morfológicas nucleares, se puede observar que *I. pustulatus* muestra una mayor variedad de estas alteraciones. Esto podría deberse a diferencias inter-específicas en la fisiología y el control de eritropoyesis, a la alimentación o el uso del hábitat, y/o a la presencia de hemoparásitos (la cuál fue significativamente mayor en *I. pustulatus* que en *M. aeneus*). Se ha demostrado que diferentes factores como el hábitat, la edad de los individuos y la presencia de grasa corporal afecta significativamente la intensidad parasitaria en los individuos a nivel intra-específico (Cadena, 2015). Sería interesante explorar estos factores a nivel intra- e inter-específico en un estudio con mayor tamaño de muestra en estas dos especies. De igual manera, el estrés al que son sometidos los individuos puede cambiar esta interacción debilitando o favoreciendo a los organismos (Gutiérrez, 2015). Las aves que viven en general con menos estrés muestran niveles más bajos de parasitemia. Por ejemplo, un estudio realizado en Brasil por Tostes en 2015, muestra aves que se encuentran en cautiverio con una prevalencia de *Plasmodium* y *Haemoproteus* de 1.51%. Sin embargo, no es claro que tan comparables son los datos obtenidos de individuos que se encuentran en cautiverio con individuos de vida libre. Los animales silvestres, a diferencia de aquellos que viven en cautiverio, presentan condiciones diferentes, se enfrentan a factores que provocan estrés entre los individuos como lo es la búsqueda de alimento, el escapar de depredadores y la reproducción.

Ambas especies del estudio se relacionan frecuentemente debido a que *M. aeneus* parasita los nidos de *I. pustulatus* por lo que son sometidas a estrés similar, cuando son polluelos (al crecer en los mismos nidos), pero este es diferente como adultos. El parasitismo del cuidado parental es considerado una estrategia adaptativa para el ave parásita mientras que para el hospedero es perjudicial, dado que disminuye su éxito reproductivo, reduce el éxito de eclosión de sus propias crías al igual que reduce la tasa de crecimiento de los pichones lo que dificulta la supervivencia de los mismos una vez que abandonan el nido (Reboreda *et al.*, 2013). Estos efectos sumados al tiempo y esfuerzo que se debe de emplear en hacer un nido, cuidar y defender a “sus” crías y buscar alimento para los pichones deja a *I. pustulatus* con un mayor gasto energético, mayor susceptibilidad a los cambios que ocurren en su entorno, y mayor exposición a los contaminantes en el ambiente, lo cual puede producir efectos genotóxicos (Suárez-Rodríguez y Marcias 2014), y una exposición constante a los parásitos. Esto se podría reflejar en una elevada cantidad de

anormalidades de los eritrocitos (en forma del citoplasma y del núcleo), mayor cantidad de eritrocitos policromáticos normales y anormales (ej. mayor tasa de reemplazo de eritrocitos), presencia de células aglobadas y mayor prevalencia e intensidad de hemoparásitos como *Haemoproteus* sp. y microfilarias en *I. pustulatus*. En cambio, los adultos de *M. aeneus* al no construir nido, encargarse del cuidado de éste ni buscar alimento para sus crías, pueden tener un menor gasto energético y menor exposición a los ectoparásitos que se encuentran en el nido (Davies, 2000). En otras palabras, los adultos de *M. aeneus* se exentan de una de las fuentes de estrés más fuertes para *I. pustulatus*, que es el cuidado parental. Dentro del conteo de eritrocitos, *M. aeneus* muestra mayor cantidad de eritrocitos maduros completamente normales, menor cantidad de eritrocitos policromáticos normales y anormales, no cuenta con parásitos *Haemoproteus* sp. y tampoco se observaron microfilarias en el barrido inicial. No presenta células aglobadas y dentro de los eritrocitos maduros presenta en general menos representación en las categorías de anormalidades de los sitios.

La coloración es otro factor potencialmente estresante debido a que se requiere para su expresión, una inversión importante. Las especies del estudio presentan coloraciones muy diferentes. La coloración predominante de *I. pustulatus* es a base de pigmentos carotenoides (amarillo, naranja, rojo), lo que puede demandar más antioxidantes y convertirse en un estrés adicional para esta especie. Los individuos tienen que demostrar que pueden lidiar con el estrés oxidante al mismo tiempo que mantiene su coloración y los antioxidantes y/o pigmentos carotenoides que invierten en el plumaje no pueden ser utilizados en el sistema inmune ni para contrarrestar el estrés oxidante (Monaghan *et al.*, 2009). En cambio, *M. aeneus* no tiene coloración de plumaje a base de carotenoides, sino coloración a base de melaninas (negro, café, gris) y los machos, cierta iridiscencia (coloración estructural). Las diferencias entre eritrocitos policromáticos, aglobados y prevalencia de hemoparásitos que se presentan entre *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* también podrían ser diferencias que existen entre las especies debido a diferencias en la fisiología, balance oxidante, y/o control de eritropoyesis. *I. pustulatus* puede ser naturalmente más propenso a tener parásitos o *M. aeneus* tener un mejor sistema inmune que le ayude cuando parasita los nidos de especies diferentes. Por esta razón, es de gran importancia contar con valores base que sirvan de referencia para cada una de las especies, con estos valores se puede determinar si se encuentran dentro del rango normal para su especie o los individuos de *I. pustulatus* y *M. aeneus* se ven afectados por un factor externo.

Hay varios ejemplos donde las alteraciones morfológicas nucleares y la prevalencia de hemoparásitos que se ven afectadas por la presencia de contaminantes (Samour, 2005; Geens *et al.*, 2010; Gonzáles, 2015; Ruiz-García, 2017). Aquí, no encontramos diferencias significativas entre sitios a diferentes

distancias de una fuente de contaminación minera. Sin embargo, al comparar nuestros valores con un conteo similar al realizado por Moreira y colaboradores (2017) en donde se evaluaron aves en cautiverio expuestas a contaminantes de la industria de la curtiduría, nuestras dos especies de estudio mostraron una proporción mayor (17.57% y 16.81% respectivamente) en la categoría de “eritrocitos con hendidura” comparado con el grupo expuesto a contaminantes para dicho estudio (10-13%). Además, para el total de anomalías nucleares nuestras especies de estudio tuvieron valores por arriba de los valores para el grupo control del estudio con el que comparamos (8-10%), (*I. pustulatus* 24.1% y *M. aeneus* 22.2%). Como se ha mencionado con anterioridad, los valores obtenidos en estudios realizados con animales en cautiverio, no son necesariamente comparables con valores obtenidos en animales en vida libre. Lo anterior, debido a que factores como la alimentación *ad libitum* y eliminación de estrés como evitar la depredación altera drásticamente las condiciones de vida. Sin embargo, son pocos los estudios realizados en animales silvestres, dejando poca literatura con la que se podrían comparar estas especies (Ruiz-García, 2017). No se debe olvidar que, si bien, en Quilamula no se encuentran contaminantes por metales pesados procedentes de la minería, es posible que haya contaminación de otros tipos, por ejemplo, por agroquímicos, como el herbicida de amplio espectro Glifosato. La actividad agrícola también afecta la estabilidad de los individuos que se encuentran constantemente expuestos a los contaminantes, lo cual no solo provoca un aumento en la cantidad de alteraciones morfológicas nucleares, sino también produce un cambio, en la prevalencia e intensidad parasitaria que tienen los organismos (Ruiz-García, 2017). También es importante considerar que, debido a que en nuestro muestreo usamos red de niebla, solo tenemos registrados individuos vivos, capaces de volar y llevar a cabo sus actividades diarias. Por lo tanto, los individuos que disminuyen su actividad a causa de infecciones parasitarias fuertes o que mueren por daños fisiológicos por contaminación, no se atrapan en las redes por lo que estos no se contemplaron en nuestro estudio. Por lo que puede existir un sesgo, y no es claro si este potencial daño severo está distribuido de forma homogénea entre los sitios. Por lo tanto, es recomendable realizar un estudio más amplio realizando un seguimiento a largo plazo de los individuos en cada uno de los sitios para determinar si hay diferencias entre sitios en variables de historia de vida como la longevidad, tasas de mortalidad, y éxito reproductivo.

Si bien los niveles en la morfología nuclear variante de los eritrocitos de aves silvestres pueden variar por rasgos individuales y de especie (Evans, 2008), también depende de los métodos utilizados en la toma de muestras sanguíneas, el sitio de punción elegido, la respuesta de sangrado de los individuos y el método de conservación de las muestras (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Por lo tanto, es de gran importancia comenzar a estandarizar los métodos y generar valores basales con los que se puedan realizar futuras comparaciones.

Un análisis adicional en *I. pustulatus* evaluando los individuos parasitados contra los no parasitados podría reflejar si hay una correlación directa con la presencia de hemoparásitos y la cantidad de anormalidades en los eritrocitos. Por ejemplo, si la presencia de hemoparásitos está asociada con una mayor proporción de eritrocitos policromáticos (generando anemia regenerativa) normales y anormales, y la presencia de células aglobadas. O por otro lado, la presencia de hemoparásitos y la proporción elevada de anormalidades de los eritrocitos podrían ser dos consecuencias de un tercer factor, que puede ser que el estrés los haga más susceptibles a los cambios en el hábitat y la presencia de contaminantes.

VIII. PERSPECTIVAS

Dentro de los valores obtenidos para *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus* en este estudio, se puede observar una diferencia muy clara dentro de la morfología variante en el citoplasma de los eritrocitos (eritrocitos aglobados), índices de policromacia y parasitemia entre estas dos especies. Sin embargo, hace falta realizar futuros estudios para poder determinar si las diferencias en estos valores son debido a una diferencia intrínseca entre especies que difieren en hábitos de alimentación y conducta o, por otro lado, depende de un factor externo que provoca esta variación. No se presentaron variaciones en los valores obtenidos con relación a la cercanía a los desechos mineros, pero se observaron promedios altos en los valores de morfología nuclear variante de los eritrocitos comparado con estudios en cautiverio, incluso en los individuos que se encuentran en el sitio control (Quilamula). Por lo tanto, se recomienda realizar un estudio determinando los valores para estas dos especies en un sitio sin presencia de actividades agrícolas y otras posibles perturbaciones antropogénicas para descartar posibles alteraciones por otro tipo de contaminación. También sería valioso hacer conteos de mayores números de células para llegar a cuantificaciones confiables de alteraciones específicas como la presencia y conteo de micronúcleos que se podrían comparar con otros estudios. De igual manera, un estudio con tamaño de muestra donde se analicen por separado edad/sexo, para conocer los posibles diferentes efectos de los contaminantes sobre diferentes grupos, explorando diversos factores a nivel intra e inter-específicos de estas dos especies. Los estudios hematológicos son de gran importancia al dar un resumen del estado de salud de los individuos; aportan una gran cantidad de información sin necesidad de sacrificar a los individuos, por lo que es importante comenzar a generar valores basales para aves que se encuentran en vida libre para permitir futuras comparaciones.

IX. Agradecimientos

Agradecimientos por financiamiento a la Animal Behavior Society.

A Jocelyn Nathaly Maldonado Gómez, Noé Hernández Alvear, Edna Serrano Rodriguez y Lorely Nitzul García Melchor, alumnos del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación y de la Facultad de Ciencias Biológicas que participaron en el trabajo de campo.

Al sínodo de evaluación constituido por: Biól. Luis Fernando Cruz García, M. en C. Félix Noel Estrada Piñero, Dr. Fernando Urbina Torres, Dr. David Valenzuela Galván por sus aportaciones a este proyecto de tesis.

X. LITERATURA CITADA

- Abosede, O., Adetola, A., & Afusat, J. (2014). Micronucleus as a biomarker of genotoxicity in village weaver bird (*Ploceus cucullatus*). *World's Veterinary Journal*. 48-53.
- Cadena-Ortiz, H., Mantilla, J. S., Rivero, J., Flores, D., Bahamonde D., Matta, N. E., Bonaccorso, E. (2018). Avian haemosporidian infections in rufous-collared sparrows in an Andean dry forest: Diversity and factors related to prevalence and parasitaemia. *Parasitology*. 1-9
- Campbell, Terry W. (2015), *Exotic Animal hematology and cytology*, Oxford, Wiley Blackwell.
- Clark, P. (2015). Assessment of avian erythrocytes that exhibit variant nuclear morphology. *Comp Clin Pathol*. 485-490.
- CONABIO: México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO (2002). *Uso de suelo y vegetación de Sierra de Huautla-Cerro frio, Morelos*.
- Davies, N. B. (2000). *Cuckoos cowbirds and other cheats*. T & A D Poyser. London.
- Duruibe, J., Ogwuegbu, M., & Egwurugwu, J. (2007). Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. *International Journal of Physical Sciences*. 112-118.
- Evans, G. O. (2008). *Animal Hematotoxicology: A Practical Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers*. CRC Press.
- Gaviño de la Torre, G. (2015). Familia Icteridae. En G. Gaviño de la Torre, *Aves de Morelos. Estudio general, guía de campo y recopilación biológica* (págs. 453-454; 458-459). Morelos: CONABIO.
- Geens, A., Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., & Eens, M. (2010). Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment*, 1174-1179.
- González, M. (2015). *Evaluación de la presencia de hemoparásitos en aves silvestres de Morelos* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.
- Gosler, A. G. (1991). on the Use of Greater Covert Molt and Pectoral Muscle as Measures of Condition in Passerines With Data for the Great Tit *Parus-Major*. *Bird Study*. 38:1-9.
- Gutiérrez, C. (2015). Una Historia con Ciencia, Sal y Aventura: ¿Cómo Responden los Ecosistemas Frente al Estrés? *Revista Eubacteria*. 35. 24-27.
- Hauptmanová, K., Benedikt, V., & Literák, I. (2006). Blood parasites in passerine birds in Slovakian East Carpathians. *Acta Protozool*. 105-109.
- INEGI: México, Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. (2014). *Minería*.

- Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., Pacheco, M. (2015). Inside the Redbox: Applications of Haematology in Wildlife Monitoring and Ecosystem Health Assessment. *Science of the Total Environment* 514: 322-332.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurement and interpretation.
- Moreira, J., Flores, M., Rodrigo da Silva, A., & Malafaia, G. (2017). A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *ResearchGate*.
- Nava-Ruiz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neuroclen (Mex)*, 140-147.
- NOM-141-SEMARNAT-2003, La caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales, México, 13 septiembre 2004.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por metales, México, 2 marzo 2007.
- NOM-155-SEMARNAT-2007. requisitos de protección ambiental para los sistemas de lixiviación de minerales de oro y plata, México, 15 de enero 2010.
- NOM-157-SEMARNAT-2009. Elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros, México, 30 AGOSTO 2011.
- OMS: México, Organización mundial de la salud, OMS. (2018). Diez sustancias químicas que constituyen una preocupación para la salud pública.
- Peplow D. (1999). Environmental Impacts of Mining in Eastern Washington, Center for Water and Watershed Studies Fact Sheet, University of Washington, Seattle.
- R: A language and environment for statistical computing. (2019). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez-Albores, J., & Ramírez-Cedillo, M. (2002). Avifauna de la región de la Sierra de Huautla, Morelos, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Zoología*, 91-111.
- Reboreda, J. C., Mermoz, M. E., Massoni, V., Astie, A. A., Rabuffetti, F. L. (2003). Impacto del parasitismo de cría del tordo renegrido (*Molothrus bonariensis*) sobre el éxito reproductivo de sus hospedadores. *Hornero* 18(2) 77-88.
- Rodak, B. (2005). hematopoyesis. En B. Rodak, *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas* (págs. 55-127). Ed. Medica Panamericana.

- Ruiz, M. G. (2017). Prevalencia y Parasitemia por Parásitos Haemosporidios (Apocomplexa) en Aves en una Zona con Presencia de Actividad Agrícola (Tesis de maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, S.L.P.
- Samour, J., ECAMS. (2005). Diagnostic Value of Hematology, Volumen II. En G. Harrison , & T. Lightfoot, *Clinical Avian Medicine* (págs. 587-610).
- Servicio Geológico Mexicano SGM. (2016). Panorama Minero del Estado de Morelos. Mexico.
- SIAM: México, Sistema Integral De Administración Minera SIAM. (2016). Valor constante de la producción.
- Suárez-Rodríguez, M., Marcias, C. (2014). There is no such a thing as a free cigarette; lining nests with discarded butts brings short-term benefits, but causes toxic damage. . *European Society for Evolutionary biology. j. evol. biol.* 27 (2014) 2719–2726.
- Tostes, R., Vashist U., Scopel K. K., Massard C. L., Daemon E. y D'Agosto M. (2015). Plasmodium spp. and Haemoproteus spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(1) 67-74.
- Tovar-Sánchez, E., Cervantes, L. T., Martínez, C. Rojas, E., Valverde, M., Ortiz-Hernández, M. L., Mussali-Galante, P. (2012). *Environmetal Science and Pollution Research*. 19: 1677-1687.
- Tovar-Sánchez, E., Mussali-Galante, P., Martínez-Pacheco. M., Sanchez-Salinas, E., Ortiz-Hernández, M., Olvera-Velona, A. (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentration in individuals residing in an arsenic contaminated área in Morelos, Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32(1) 101-117.
- Velasco Trejo, J. A., de la Rosa Pérez, D. A., Solórzano Ochoa, G., Volke Sepúlveda, T. L. (2004). Primer informe del proyecto: Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. México D.F.



Cuernavaca, Mor., 19 de octubre 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES,
UAEM. P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Claudia Cristina Valenzuela Inzunza**, con el título del trabajo **Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad a desechos mineros en Huautla, Morelos.** En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI _____

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE|

DRA. MARCELA OSORIO BERISTAIN



Cuernavaca, Mor., 20 de octubre del 2020.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Claudia Cristina Valenzuela Inzunza**, con el título del trabajo **Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad a desechos mineros en Huautla, Morelos.** En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: Si, voto a favor

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: el trabajo está completo, de acuerdo con sus objetivos, excelente trabajo

COMENTARIOS: una revisión en la corrección de estilo mejoraría la presentación

A T E N T A M E N T E

DR. FERNANDO URBINA TORRES



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO URBINA TORRES | Fecha: 2020-10-20 12:13:14 | Firmante

nlgTD5a7RjMRQhK8DvBstropNscK5aVw6LwxjxShs0dxlODWzrR9VyAQHagohO/cGF35LQ5XySbAeJUVdTX0ts/raH2CdEvMGzu7Uqdfdxdw5NHEJUW2RLAVOikQLiObGsyyst1fahnlQnWk/XsAdQuYnNW2hwbdQz9B5MmBqqqtEF4u9aPrOJNj9D+DE+/jYBmj92dzswhqX11WA5kap1eqP7ndcyq1NU2Ddekb5EythP6hFMHH1c3N5uqjT7cXzL+aSwKpdEbiGIN7DELxUCqhx25Y28c4lo/kKwq2thFCgCMDa3KzCIHw3Dx3Ph9wg+ai+S8Q3eaggfA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8thYpk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WumFpoIRk8JU6WDIO3GkDCTN2RL7Caty>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Licenciatura en Biología
Programa Educativo de Calidad Acreditado por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Mor., _____

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Claudia Cristina Valenzuela Inzunza**, con el título del trabajo **Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad a desechos mineros en Huautla, Morelos.** En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____ SI _____

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____ NO _____

COMENTARIOS: _____

A T E N T A M E N T E

BIÓL. LUIS FERNANDO CRUZ GARCÍA



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS FERNANDO CRUZ GARCIA | Fecha: 2020-10-26 13:07:58 | Firmante

[AunHflaUAC12cFv1dNfgy1WAs8pFu8T2dELKjZRw]m0LHc4s03HpuIz5n73pSpI0kpoerR6jRW6np0l2comax0mpGGjMBQglrqmKWAXsT6aH/VZOEj1Kc2qPFHsVDIdbkjstyBNU4sbBY0SyvWNZLMUA7C117xzMH0g25KKKB9CDzlgDaCxhyHtdO4Mbe0SdAWpBgWIMZE+wV+3ou9g6KdHfX0CjzwF/WcxrPwtIOL4JTE7PcpYsID+ZXuzL051AExTo8e+WESIsGfk9eWVv3Ge4Uxvb9CaGOLQMulAxtxXYTbCWYEgEFy0uQE85VkG6jZPCaumFDMaXqtA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[FEateu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1E90o5wawnib0wZHIRSxITysEGziHTUz>





Cuernavaca, Mor.,_28 de octubre de 2020_

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Claudia Cristina Valenzuela Inzunza**, con el título del trabajo **Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad a desechos mineros en Huautla, Morelos**. En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: A FAVOR _____

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

A T E N T A M E N T E

DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAVID VALENZUELA GALVAN | Fecha: 2020-10-28 18:50:35 | Firmante

hXqs+bXjqkqTOi9a9pnrREeeIEyWAdxeOU9DgqCkWxCHeD0idsMI+PyRuWw6xxOORkIX0h6E6HPVK3rin4C6m1hwVx8q7kE18jktlau/Bf9i8v6MwM89AZtmE3LioKj1HpqieYS
ueqloCx736/F+OsyRIYA7/sZ6DFwJxxOUrbQBRRfyV2C/8wGaQDHgk9IXn4Sw2d3jSKCpOhbxT5ZfnigWtaPLiIR5diaSE2TNWgG9zkS7j+zCSQ2kuk3v49QxbQ/7JLDIqIP6rZb45
SwcXDtutDaCwifMnzQ79i6BqDkKwegKyMGXAYSFaUMDvQSmYrFIUa3Y11p+agw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



JIVOTL

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NW1j5Vg716VhdSiAPZoMGCR5YaK7j/>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Mor., a 28 de octubre de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Claudia Cristina Valenzuela Inzunza**, con el título del trabajo **Hematocrito, morfología variante de eritrocitos y presencia de hemoparásitos en *Icterus pustulatus* y *Molothrus aeneus*: parámetros basales y relación con la proximidad a desechos mineros en Huautla, Morelos.** En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: A favor

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE

M. EN C. FÉLIX NOEL ESTRADA PIÑERO