

88 - A

COD. No. 83029455

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



“ MICRONUCLEOS EN DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS ”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

JOSE ANTONIO CAMACHO PEREZ

GUADALAJARA, JAL., NOVIEMBRE 1994



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

1031/94

C. JOSE ANTONIO CAMACHO PEREZ

P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "MICRONUCLEOS EN DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M. en C. Guillermo Moises Zuñiga González.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal 21 de Septiembre de 1994

EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fernando Alfaro Bustamante
DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

Guillermo Moises Zuñiga González
BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- M.en C. Guillermo Moises Zuñiga González, Director de Tesis.-pte.
c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/cglr.

C. Dr. *Fernando Alfaro Bustamante*
Director de la facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E .

Por medio de la presente, nos permitimos
informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que
realizó el (la) Pasante Camacho Pérez José Antonio
código número 083029455 con el título _____

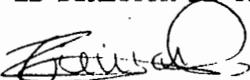
Micronúcleos en diferentes especies de Mamíferos
consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión
de la misma y la realización de la misma de los exámenes
profesionales repectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que
haya lugar.

A T E N T A M E N T E

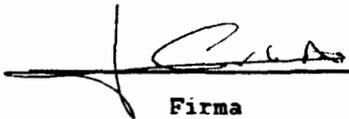
Guadalajara, Jal., a 14 de Noviembre 1994

EL DIRECTOR DE TESIS


M. en C. *Guillermo Moises Zúñiga González*

SINODALES

- 1.- M. en c. Carlos Alvarez Moya
Nombre Completo
- 2.- M. en C. Patricia Castro Felix
Nombre Completo
- 3.- M. en C. Enriqueta Franco
Nombre Completo


Firma

Patricia Castro
Firma


Firma

**MICRONUCLEOS EN DIFERENTES
ESPECIES DE MANIFEROS**

El presente trabajo se realizó en la División de Medicina Molecular, del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

Bajo la dirección de:

M. en C. GUILLERMO ZUÑIGA GONZALEZ

Y la asesoría de:

M. en C. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA

I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	10
JUSTIFICACION.....	18
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y METODOS.....	24
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	48
GLOSARIO.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

I N T R O D U C C I O N

La alta contaminación en diferentes ciudades del mundo ha sido asociada con el incremento en el riesgo, entre otros efectos nocivos para la salud, de contraer cáncer (1). Desde los años cuarenta se demostró que extractos de partículas llevadas por el viento pueden producir tumores en ratones. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que el desarrollo de tumores es un proceso de múltiples etapas, que inicia con una mutación (2). Las teorías actuales tienden a considerar a la oncogénesis y a la mutagénesis como expresiones diferentes de un mismo mecanismo básico. La mayor parte de los agentes oncógenos pueden causar mutaciones y se ha demostrado que muchos mutágenos producen tumores en condiciones de prueba apropiados (3). Varias actividades humanas incrementan la contaminación; algunos agentes físicos como las radiaciones pueden ocasionar mutaciones y daño celular (4,5); agentes químicos, como los residuos de las minas, pesticidas para la agricultura y desechos urbanos, entre otros, pueden afectar a ecosistemas marinos y, subsecuentemente, dañar al hombre a través de cadenas tróficas. Un primer paso para evitar el incremento de daño ecológico, es impedir la liberación de sustancias tóxicas al medio ambiente, mismas que pueden ser detectadas con organismos indicadores. El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos, requiere de una gran precisión y de un conocimiento amplio del contaminante a verificar; además, su evaluación esta limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto,

los bioensayos ofrecen ventajas, ya que un organismo dado puede procesar o metabolizar un compuesto cualquiera a su forma tóxica (6).

Diversos químicos medioambientales e industriales causan daño en animales experimentales con resultados consistentes. Este potencial para efectos similares en el hombre es obvio, así, el daño citogenético en el humano está generalmente asociado a algún padecimiento clínico. El método clásico para observar daño citogenético es el examen de preparaciones en metafases de células tratadas con el agente a probar in vivo o in vitro. Desafortunadamente, este estudio es costoso, consume mucho tiempo y la mayoría de las veces requiere de la observación de un gran número de metafases para poder concluir validez estadística (7,8). Otros estudios citogenéticos utilizados en la identificación de genotóxicos es el intercambio de cromátides hermanas (ICH), el conteo del índice mitótico y la prueba de micronúcleos (MNs). ^o 0) 0 ₁ ②

La prueba de los MNs in vivo sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo, forman estas estructuras (9,10); permite también detectar tanto agentes clastogénicos como aneuploidogénicos (que afectan el uso mitótico) (8,11), pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MNs (7,12)(fig. 1). *Indicados*

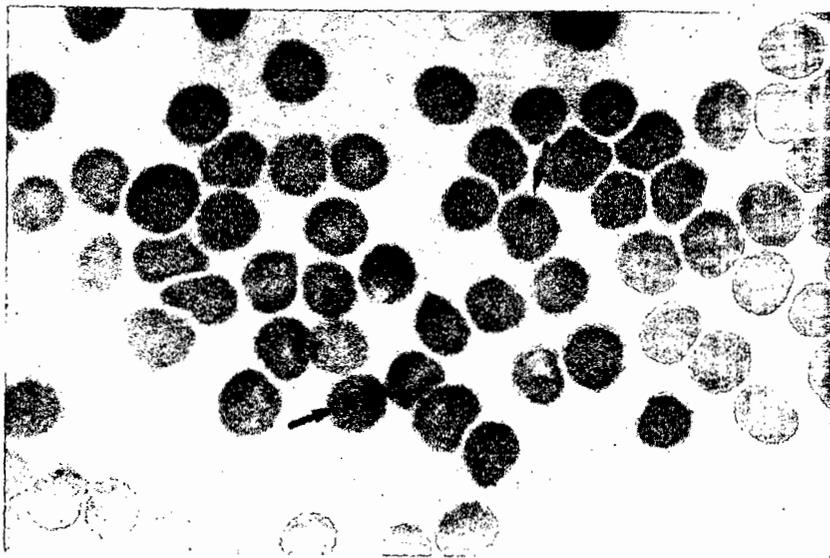


Figura 1 Eritrocitos de sangre periférica de un ratón esplenectomizado, teñidos con Wright y Giemsa en donde se pueden apreciar, dos eritrocitos micronucleados de diferentes tamaños (2250X).

La técnica clásica de MNs es ampliamente aceptada y se realiza en diferentes especies y en gran variedad de tejidos. Es posible encontrar MNs en eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea (9), cultivos de linfocitos de sangre periférica (10,13) y recientemente el análisis de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de ratones expuestos por lo menos 4 días a un agente con probable efecto genotóxico (14). Otros estudios en queratinocitos han mostrado utilidad para investigar tanto genotoxicidad como carcinogénesis ya que la aparición de MNs puede ser un signo inicial de cáncer de piel (15). Así mismo, en células de mucosa bucal, la presencia de MNs se ha encontrado asociada a alteraciones citológicas en individuos fumadores o personas que consumen otros productos derivados del tabaco, comida condimentada, alcohol, quimioterapia antiblástica, cafeína y personas expuestas a radiaciones ionizantes, entre otras (16,17).

El análisis de MNs en mucosa bucal puede tener ventajas sobre la de linfocitos ya que se realiza directamente sin la elaboración de cultivos, así como también refleja el efecto genotóxico ocurrido en la capa basal. Entre 1982 y 1984 Stich et al. propusieron el uso de la prueba de MNs en células exfoliadas humanas como un índice de "dosimetría interna" para identificar la acción de agentes clastogénicos y carcinogénicos (18).

También se utilizaron los hepatocitos de rata, induciendo la división celular mediante la extirpación de 2/3 partes de hígado, o bien con promotores mitogénicos, facilitando con esto la

manifestación de los MNs en hepatocitos nuevos, cuando se exponen a agentes genotóxicos (19), o carcinogénos (20,21). Muchas sustancias químicas mutagénicas u oncogénicas deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado (22). Por esta razón cualquier prueba in vitro debe incluir un sistema de activación metabólico del compuesto original mediante una preparación de microsomas de hígado (2). De la misma manera puede realizarse en células germinales en las que de existir un daño genético, éste podría ser transmitido a la descendencia (22,23).

Se pueden utilizar animales de laboratorio específicos para los diferentes agentes a probar, los más comunes son la rata (24), el ratón (11,25), el hamster (8) y algunos primates como Macaca fascicularis, en el que los estudios se han extendido a médula ósea de fetos de madres tratadas con quimioterapéuticos (26).

Prob.
Dio P.

En los últimos años, se han propuesto otros tipos de organismos vertebrados no mamíferos tales como el Xenopus laevis y el Pleurodeles waltl, anfibios cuyos eritrocitos son grandes, lo que facilitan la observación de los MNs (27), o algunas aves, con las que también se puede tener un sistema in vivo (28).

Por último, las plantas se están tomando en cuenta cada vez más como medios de prueba ya que también pueden manifestar daño por agentes contaminantes de efecto genotóxico con la formación de MNs (29).

A

001222

D E N T E S

En hematología, los MNs se conocen como cuerpos de Howell-Jolly cuya forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 1/20 a 1/5 del tamaño normal de un eritrocito. Estas estructuras son las anormalidades más características después de la esplenectomía por lo que su presencia puede indicar un mal funcionamiento del bazo (9,30,31).

La formación de los MNs se basa en el siguiente principio: en) *Fundamento*
anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse al núcleo, pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero darán origen a los núcleos de las células hijas regulares. Los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción considerable es transformada en uno o varios núcleos secundarios. Esto son como regla mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de MNs (8). Similares eventos ocurren si se daña la función del aparato mitótico, por ejemplo, bajo la influencia de la colchicina, el núcleo principal es algunas veces reemplazado por un grupo completo de pequeños núcleos, que en general, son considerablemente más grandes que los típicos MNs (8,12)(fig. 2).

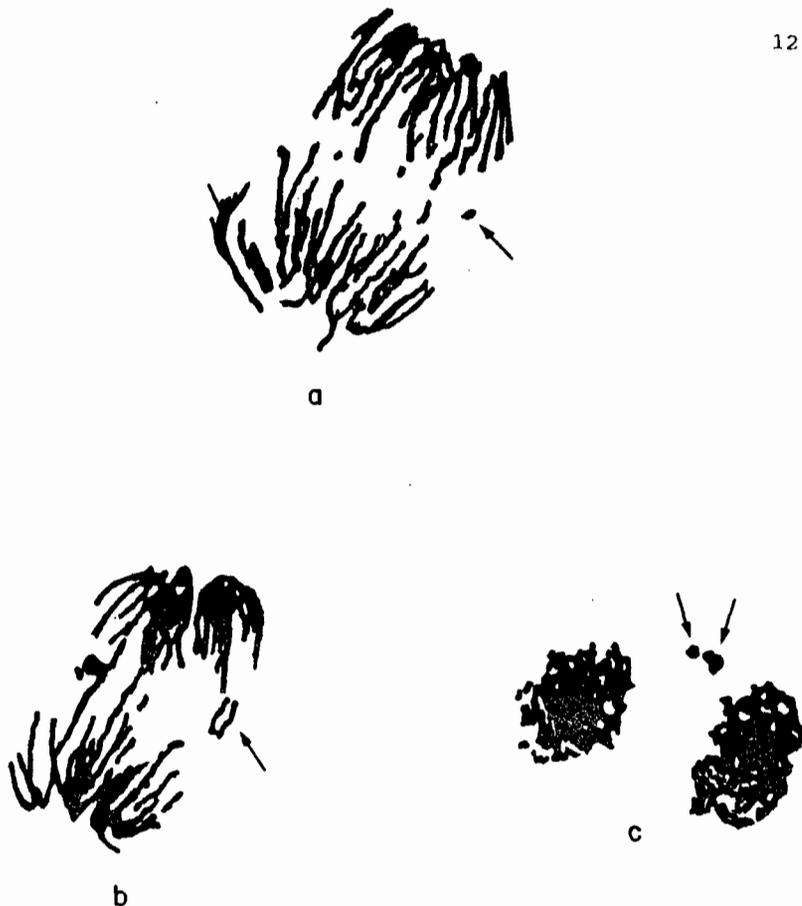


Figura 2

FORMACION DE MICRONUCLEOS

- a. anafase.- en la que se observan fragmentos cromosómicos
- b. rezago anafásico de un cromosoma
- c. elementos que quedan fuera del núcleo dan origen a los MNS

En mamíferos, aproximadamente 5 horas después de completar la última mitosis, los eritroblastos expelen su núcleo permaneciendo en el eritrocito sólo los MNs y es entonces cuando es posible visualizarlos (11). Debido a que los eritrocitos jóvenes (EPC) no pierden los ribosomas (por aproximadamente 24 horas después de la enucleación) se tiñen de color azul-gris con el colorante de Giemsa, facilitando su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas a períodos cortos de exposición (fig. 2) (8,32)

La sangre atraviesa la malla de la pulpa esplénica desde las arteriolas terminales, el flujo a través de la pulpa roja es lento y el volúmen plasmático es mínimo, sometiendo la maquinaria metabólica del eritrocito a mayor esfuerzo (32). Por último, para alcanzar la circulación venosa, el eritrocito debe estrecharse para pasar a través de un orificio pequeño de 2 - 3 μ en la pared sinusoidal. Esta es la prueba final de flexibilidad del eritrocito (30,32).

DIAP
LIBRO
x

Los MNs son las anormalidades más comunes en los eritrocitos después de la esplenectomía de pacientes con problemas hematológicos, por lo que su presencia, puede indicar mal funcionamiento del bazo, este ejerce un control de calidad sobre la masa de eritrocitos, manifestandose por el aumento de estas formas circulantes después de la esplenectomía (31) y como parte

del sistema retículo endotelial participa en la degradación de los eritrocitos con residuos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly), inclusiones de hemoglobina desnaturalizada (cuerpos de Heinz), siderocitos y células deformes o fragmentadas (30-32).

Los mecanismos de acción de los diferentes agentes químicos que causan rompimiento cromosómico varían, algunos afectan a los grupos sulfhidrilo de proteínas, mientras que otros actúan sobre las ligaduras de hidrógeno de los ácidos nucleicos, también en ocasiones pueden afectar el sistema de óxido - reducción dentro del núcleo (3).

Cuando los pacientes con problemas hematológicos como purpura trombocitopénica, anemia hemolítica, leucemia granulocítica, no sanan aún después de recibir quimioterapia citotóxica (QC), son valorados para esplenectomía, ya que la mayoría de las veces, los pacientes mejoran con este tratamiento. Sin embargo, si los pacientes aún así no responden al tratamiento, siguen recibiendo algún tipo de medicamento, que generalmente son quimioterapéuticos antineoplásicos o fármacos citotóxicos, dirigidos a las células que se han malignizado y que de alguna manera afectan al DNA. (fig. 3) (31).

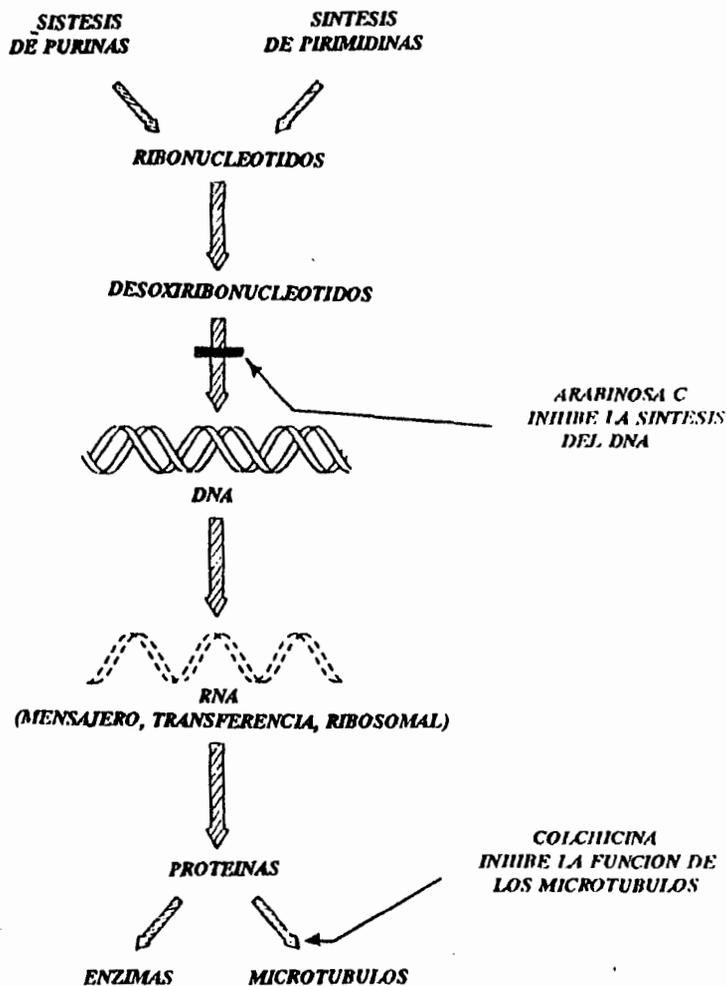


Figura 3 Mecanismos y sitios de acción de la colchicina y arabinosa-C, usados como agentes quimioterapéuticos.

En estudios realizados por nuestro grupo con pacientes esplenectomizados se encontró un aumento significativo de MNs con una $p > 0.001$ al comparar un grupo con QC contra un grupo sin medicamento; obteniéndose 66.96 ± 18.25 y 29.15 ± 7.11 respectivamente que son valores altos en relación con los encontrados en pacientes con bazo y QC 2.5 ± 1.52 (33).

Dentro de las ventajas de la técnica clásica de MNs se incluyen facilidad y rapidez, la posibilidad de probar solamente un químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular, y el hecho de que los MNs formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (8). Dentro de sus limitaciones está el hecho de que la prueba no detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de fragmentos acéntricos como translocaciones e inversiones), tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen, ni cuando se prueban genotóxicos órgano-específicos o especie-específicos. Por otra parte, puede dar falsos negativos en el caso de procarcinógenos y promutágenos que requieren activación metabólica en períodos cortos de exposición (8).

J U S T I F I C A C I O N

El constante efecto nocivo de los contaminantes ambientales sobre la salud humana y la necesidad de conocer dichos efectos, obliga a la búsqueda de nuevos métodos y modelos de evaluación, ya que, los actuales están enfocados a ser utilizados en pruebas con agentes de efecto genotóxico conocido.

Por esto, pretendemos buscar otros organismos que sirvan como monitores de contaminantes ambientales de efecto genotóxico a nivel cromosómico mediante la prueba de formación de MNs, información que podría darse en forma directa y en su hábitat natural.

H I P O T E S I S

- 1.- Además de los animales de laboratorio estudiados, existen otros mamíferos que presentan MNs en eritrocitos de sangre periférica.

- 2.- El modelo esplenectomizado presenta mayor número de MNs que el no esplenectomizado, al exponerlos a agentes genotóxicos.

O B J E T I V O S

OBJETIVOS GENERALES:

1. Identificar MNs en eritrocitos de sangre periférica en diferentes especies de mamíferos.
2. Observar la sensibilidad de las especies estudiadas con y sin esplenectomía, a los agentes genotóxicos mediante el conteo de MNs.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1 Cuantificar el número de MNs espontáneos en eritrocitos de sangre periférica en diferentes especies de mamíferos.
- 1.2 Comparar el número de MNs espontáneos en eritrocitos de sangre periférica entre las diferentes especies estudiadas.
- 2.1 Esplenectomizar uno de los grupos de mamíferos y probarlo con inductores genotóxicos para verificar si se vuelve más sensible como sucede en el humano.

M A T E R I A L
Y
M E T O D O S

MATERIAL :**Material no biológico:****EQUIPO:**

Microscopio fotónico (Zeizz)

INSTRUMENTAL MENOR:

Portaobjetos

Jeringa de 1 ml

Estuche de disección

Hilo para sutura (VIERILY 0000 Y CATGUT 0000)

(absorbible y no absorbible)

REACTIVOS:

Colorante Wright (I.M.S.S.)

Colorante Giemsa (I.M.S.S.)

Agua destilada (PUREZA)

Aceite de inmersión (AMSA Cat. 515)

(tipo A, baja viscosidad)

Arabinosa C (Alexan) (FARMITALIA CARLOERBA)

Agua inyectable (SECTOR SALUD)

Colchicina (SIGMA Cat. 3915)

Ketamina (SECTOR SALUD)

Material biológico:

<u>Equis ecus</u>	(pony)
<u>Lama glama glama</u>	(llama)
<u>Tamazate americana</u>	(venado temazate)
<u>Ratus norvergicus</u>	(rata)
<u>Mus musculus</u>	(ratón)
<u>Felinus domesticus</u>	(gato siames y gato común)
<u>Canis familiaris</u>	(perro)
<u>Sus crofa</u>	(cerdo)
<u>Meriones unguiculatus</u>	(gerbo)
<u>Gorila gorila</u>	(gorila)
<u>Papio sphinx</u>	(mandríl)
<u>Pongo pygmaeus</u>	(orangutan)
<u>Oryctolagus cuniculus</u>	(conejo)
<u>Mesocricetus auratus</u>	(hamster)
<u>Macaca mulatta</u>	(mono rhesus)

METODO :

El presente estudio se realizó en dos etapas: la primera consistio en la obtención de MNs espontáneos en diferentes especies de mamíferos y la segunda en la selección de un grupo de estudio cuya frecuencia de MNs fue alta.

ETAPA I

Se colectaron 59 muestras de sangre periférica con EDTA al 10 % en solución salina como anticuagulante de diferentes especies de mamíferos, tales como: Equis ecus (pony), Lama glama glama (llama), Tamazate americana (venado tenamazate), Ratus norvergicus (rata), Mus musculus (ratón), Felinus domesticus (gato siames y gato común), Canis familiaris (perro), Sus crofa (cerdo), Meriones unguiculatus (gerbo), Gorila gorila (gorila), Papio sphinx (mandril), Pongo Pygmaeus (orangutan), Oryctolagus cuniculus (conejo), Mesocricetus auratus (hamster), Macaca mulatta (mono rhesus); proporcionadas por el Zoológico Guadalajara y por el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente,

Las muestras fueron registradas y procesadas de la siguiente manera:

- 1) Se elaboraron 2 frotis de cada muestra sobre portaobjetos limpios y libres de grasa, dejándolos secar a temperatura ambiente por 24 horas, se tiñeron con colorante Wright durante 3 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada y se sumergieron en solución Giemsa (3 ml. de Giemsa en 50 ml de amortiguador de fosfatos a pH 6.8), durante 10 minutos (tinción convencional para una diferencial leucocitaria).
- 2) De los dos frotis elaborados por muestra, uno se dejó como archivo para ser utilizado sólo en caso necesario y el otro fue observado al microscopio con el objetivo de inmersión, cuantificando el número de MNs en 4 series (cada serie de 10,000 eritrocitos) por laminilla y promediando los 4 valores.
- 3) Una vez obtenido el promedio de MNs de las diferentes especies estudiadas, fueron comparadas entre si.
- 4) El grupo de los gerbos fue seleccionado por su fácil manejo y porque mostró un número mayor de MNs al compararlo con los otros grupos.

ETAPA II

Con los valores obtenidos en la etapa I, se realizaron los siguientes experimentos:

GRUPO DE GERBOS:

- 1) Se pesaron los gerbos y se formaron 4 grupos entre ellos:
el primer grupo control
el segundo grupo esplenectomizados
el tercer grupo no esplenectomizados QC
el cuarto grupo esplenectomizados con QC
- 2) Para la toma de las muestras del grupo control se les cortó la punta de la cola, previa anestesia con ketamina (2.7 ml/kg de peso).
- 3) La esplenectomía del segundo y cuarto grupo, se realizó de la siguiente manera:
 - Se colocó el animal en posición decúbito-dorsal, previa anestesia general, rasurado y asepsia de la región abdominal.
 - Se realiza una incisión en la parte media izquierda de aproximadamente 1 cm en la cavidad abdominal (se corta piel, tejido celular subcutáneo y músculo), se expone el bazo y se localiza el tronco vascular (donde se encuentra localizado el bazo), para realizar la hemostasia del vaso mediante dos ligaduras proximal y distal, se corta el tronco vascular en medio de las ligaduras, verificandose que no exista sangrado y se procede a la sutura.

- 4) A cada individuo de los diferentes grupos (excepto el control) se les administró 0.2583 ml/kg de peso de Colchicina y 6 mg/kg de peso de Arabinosa C en 0.2 ml. de agua inyectable intraperitonealmente, durante cuatro días, Los inductores utilizados, con modo de acción diferente, fueron la **Arabinosa C (clastogénico)** y la **Colchicina (aneuploidogénico)**.

La arabinosa C es un análogo de base e inhibidor metabólico, este compuesto es convertido en el nucleótido trifosfatado intracelularmente (Ara-CTP), inhibe la síntesis del ADN, la reducción del fosfato de citidina a su desoxicompuesto y en forma competitiva la DNA polimerasa dependiente del RNA (31,34)(fig. 3).

La Colchicina es un compuesto que actúa bloqueando la formación del huso mitótico para que se lleve a cabo la mitosis (31,34)(fig. 3).

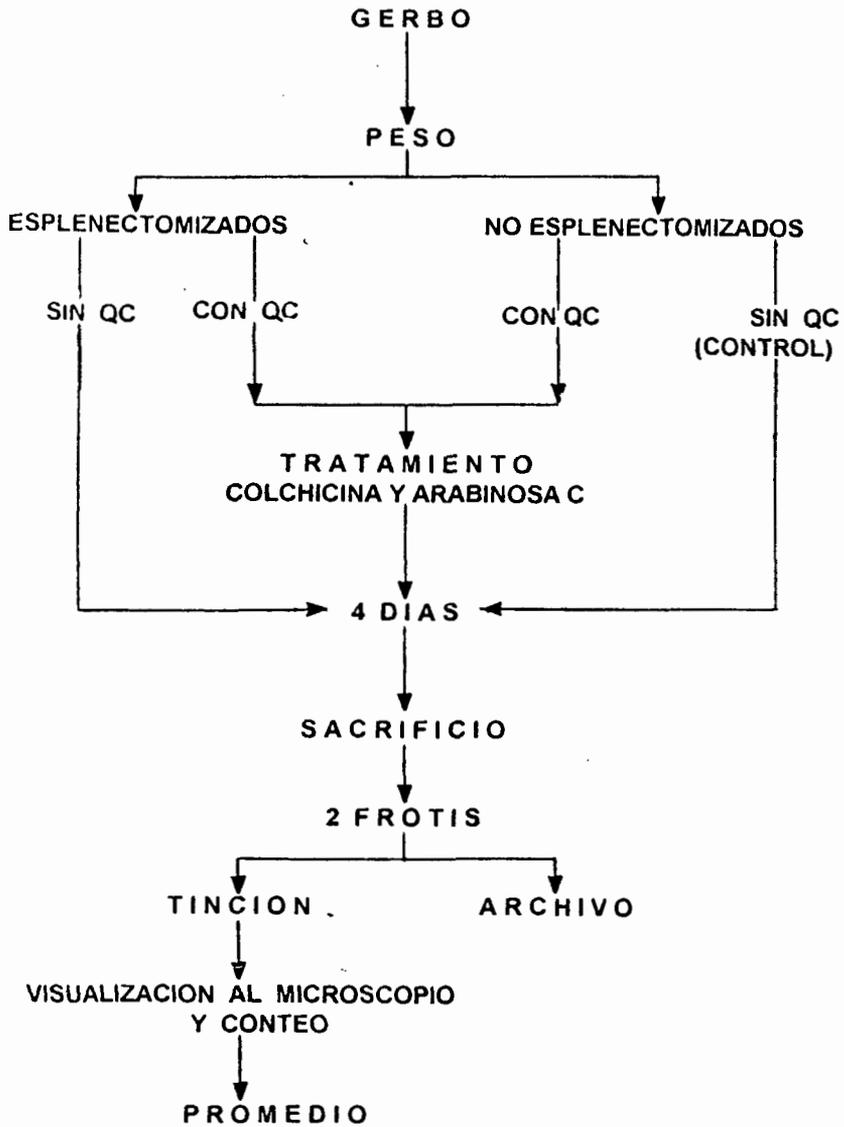
- 5) Al quinto día se obtuvo la muestra de sangre y el peso de los gerbos, posteriormente fueron sacrificados, verificandoles la esplenectomía para el segundo y cuarto grupo (diagrama de flujo).
- 6) Los valores obtenidos al contar 2 series de 10,000 eritrocitos, en cada muestra, se promediarón y se compararon con el grupo control.

GRUPO DE CONEJOS:

Para el experimento con este grupo se procedio de manera similar al grupo de los gerbos, descrito anteriormente, con la diferencia que las muestras de sangre fueron obtenidas de la oreja del conejo.

DIAGRAMA DE FLUJO

31



R E S U L T A D O S

Etapa I

En la tabla I se presentan los resultados obtenidos de las diferentes especies de mamíferos estudiados (primates, ungulados, roedores, felinos, caninos y lagomorfos), siendo el ratón, el gato, el gerbo y el cerdo, las especies con el mayor número y los primates en general, los que tuvieron menos MNS espontáneos.

En la fig. 1 se pueden apreciar las diferencias de tamaño de los MNS en unos eritrocitos de ratón.

De la fig. 4 a la 7 se muestran MNS en algunas de las especies estudiadas.

De la fig. 8 a la 14 se presentan fotografías de algunas de las especies estudiadas.

Etapa II

La prueba estadística de t de student aplicada al grupo de los gerbos mostró que (tabla II):

- 1) Al comparar el grupo control y el grupo de los esplenectomizados, no se encontro diferencia significativa.
- 2) Al comparar el grupo control y el grupo de gerbos no esplenectomizados con tratamiento de QC hubo diferencia significativa con una $p < 0.01$.

- 3) El grupo control comparado con el grupo de gerbos esplenectomizados con QC, mostró una diferencia significativa con una $p < 0.001$.

En la tabla II se puede observar el aumento de los MNs en el grupo de gerbos no esplenectomizados con tratamiento de QC, asimismo, es posible ver una elevación en el número de MNs en los gerbos esplenectomizados con y sin tratamiento. Así como, también se puede apreciar que el grupo control muestra un número de MNs en forma espontánea, mientras que con esplenectomía este número se incrementó.

Al realizar la confrontación entre los grupo de gerbos no esplenectomizados con QC y esplenectomizados con QC se observó una diferencia, no significativa estadísticamente (tabla II).

Los conejos esplenectomizados no mostrarán diferencias en el número de MNs al compararlos con los controles, ni aún con QC (tabla III)

TABLA I

MNs EN DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS

<i>ESPECIE</i>	<i>NUMERO DE MUESTRA</i>	<i>PORCENTAJE</i>	<i>FRECUENCIA</i>
PRIMATES			
<i>Orangutan</i>	2	0.0054	1/1,844
<i>Gorila</i>	2	0.0083	1/11,921
<i>Mandrill</i>	4	0.0110	1/9,016
<i>Mono rhesus</i>	1	0.0260	1/3,846
UNGULADOS			
<i>Pony</i>	1	0.0194	1/5,141
<i>Antilope negro</i>	1	0.0166	1/6,000
<i>Llama</i>	2	0.0340	1/2,941
<i>Venado temazate</i>	1	0.0390	1/2,520
<i>Cerdo</i>	7	0.0730	1/1,363
ROEDORES			
<i>Rata</i>	5	0.0275	1/3,636
<i>Ratón</i>	5	0.3230	1/309
<i>Gerbo</i>	8	0.0960	1/1,035
<i>Hamster</i>	6	0.0600	1/1,644
FELINOS			
<i>Gato siames</i>	3	0.1150	1/870
<i>Gato común</i>	2	0.1300	1/769
CANINOS			
<i>Perro</i>	4	0.0360	1/2,777
LAGOMORFOS			
<i>Conejo</i>	4	0.022	1/4,545

TABLA II
MNs EN GERBO

GRUPOS	NUMERO DE MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACION STANDAR	Sl
Esplenectomizados	6	11.50	2.02	No
No esplenectomizados con QC	3	16.83	4.80	P
Esplenectomizados con QC	6	21.90	5.01	$P < 0.001$

Todos los grupos estan comparados contra el grupo control

TABLA III
MNs EN CONEJOS

GRUPOS	MNs	NUMERO DE MUESTRA
CONTROL	2.4	3
CON QC	1.85	2
ESPLENECTOMIZADO BASAL	2.75	2
ESPLENECTOMIZADOS CON QC	2.75	2

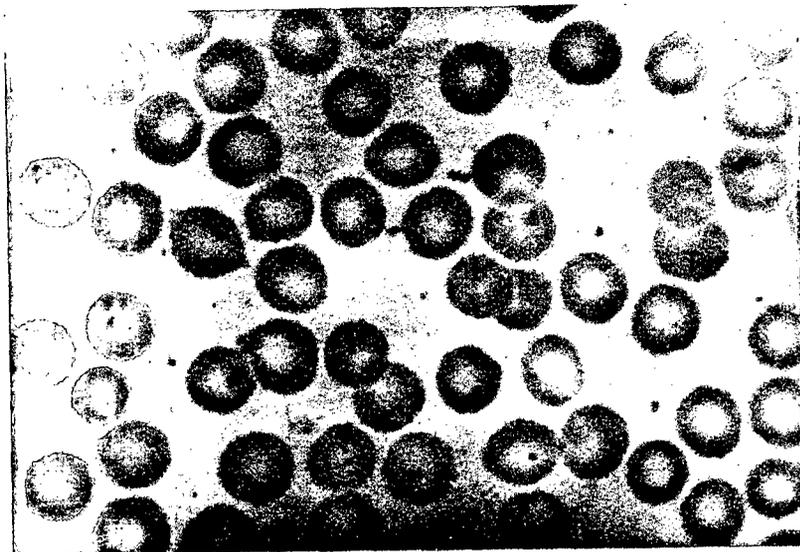


Figura 4 Sangre de mandril teñida con Wright y Giemsa en donde se observa un eritrocito micronucleado (2250 X).

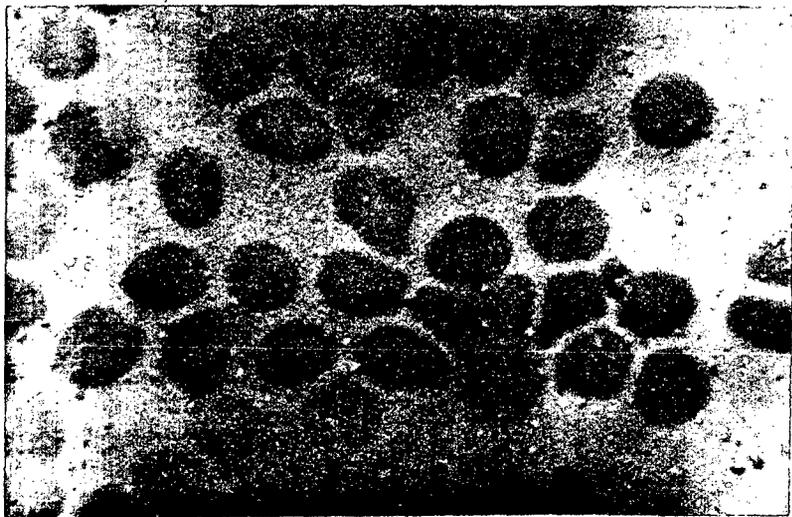


Figura 5 Sangre de gorila teñida con Wright y Giemsa en donde se observa un eritrocito micronucleado (2250 X).

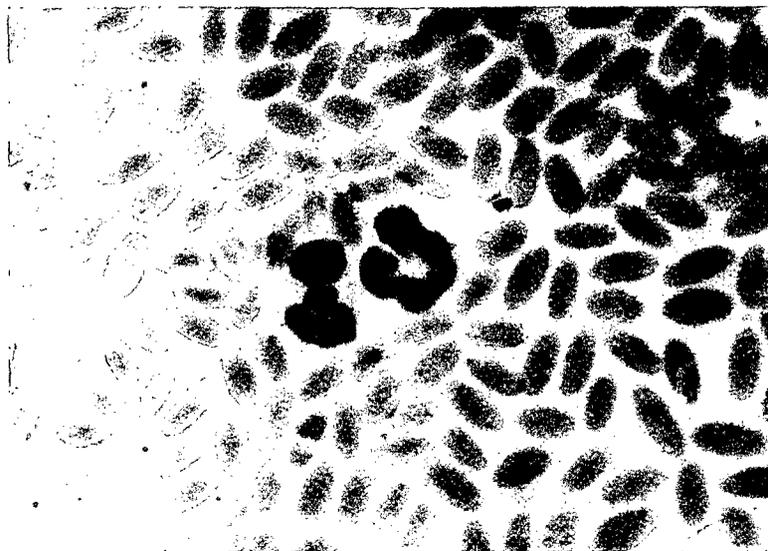


Figura 6 Sangre de llama teñida con Wright y Giemsa en donde se observa un eritrocito micronucleado (2250 X).

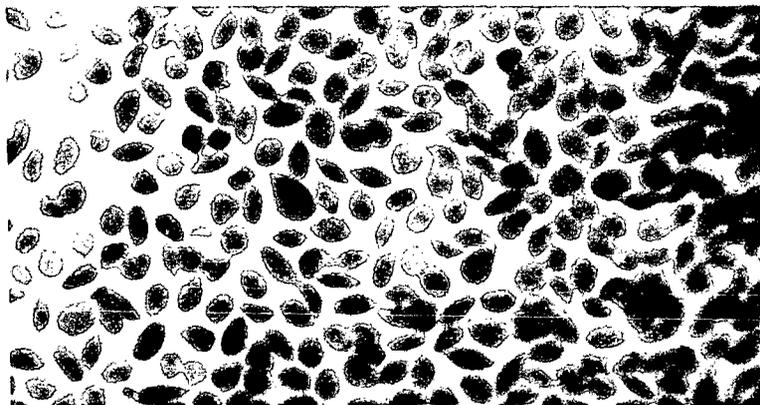


Figura 7 Sangre de venado temazate teñida con Wright y Giemsa en donde se observa un eritrocito micronucleado (2250 X).



Figura 8 RATA



Figura 9 RATON

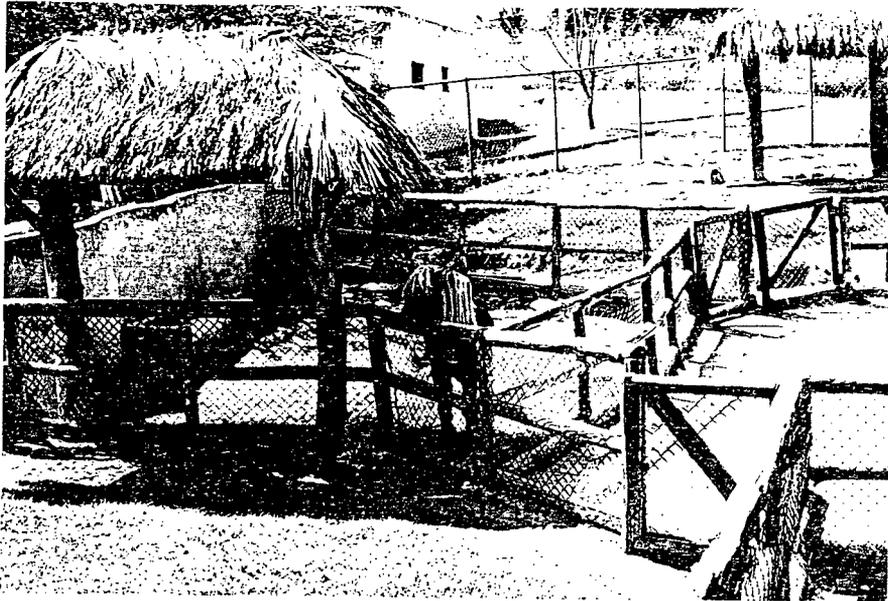


Figura 10 PONY



Figura 11 LLAMA

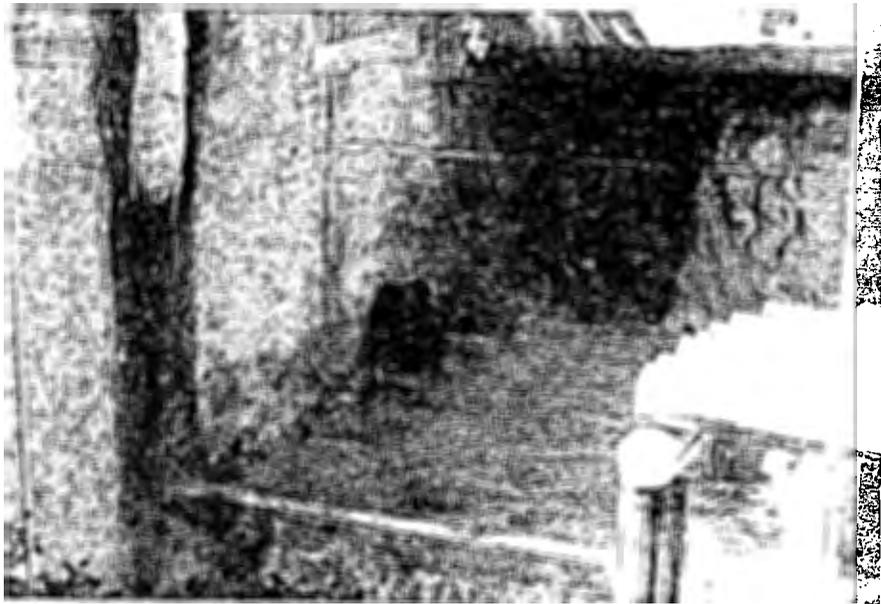


Figura 12 ORANGUTAN

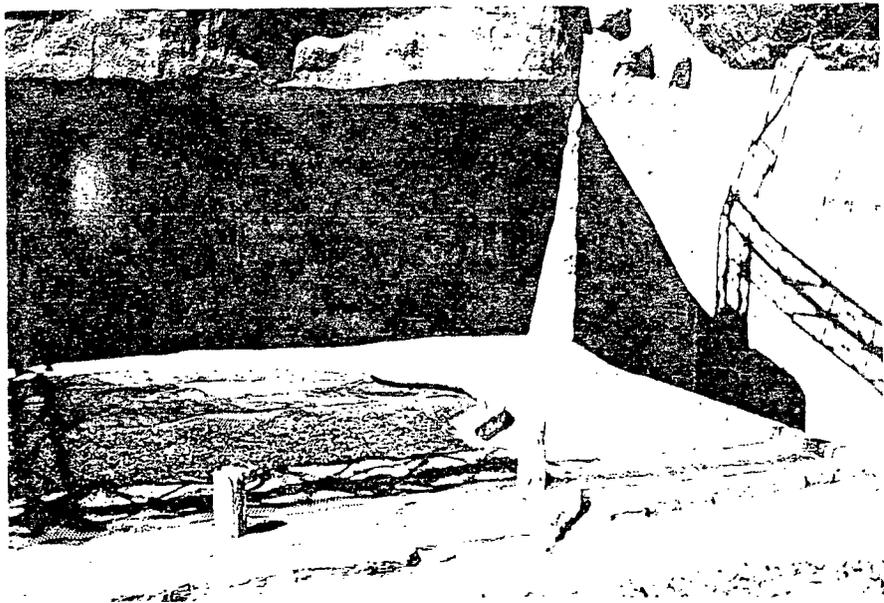


Figura 13 MANDRIL



Figura 14 GERBO

D I S C U S S I O N

En todas las especies estudiadas se puede cuantificar la presencia de los MNs en cantidades variables, esto concuerda con lo hipotetizado por otros autores (8).

Para identificar el número de MNs de cada especie se contaron 4 series de 10,000 eritrocitos y se promediaron, con este número se pretende tener un buen muestreo de la laminilla contada debido a que como se reporta en la literatura (35), los MNs no se distribuyen de manera uniforme en el frotis.

El tamaño de los MNs nos indica el tipo de compuesto utilizado: Clastogénicos (fractura cromosomas) produce MNs pequeños, mientras que los Aneuploidogénicos (daña la formación del huso mitótico) son MNs grandes.

En lo que se refiere al proceso evolutivo del bazo en las diferentes especies estudiadas encontramos variación al número de MNs presentes.

En el presente estudio se observa un número menor de MNs en los primates, como sucede en el humano (primate), no obstante en los grupos del gerbo y el ratón ambos roedores (menos evolucionados filogenéticamente) el número de MNs fue de los más altos, pero no se puede generalizar, puesto que la rata presentó un número bajo de MNs, así como el conejo (lagomorfo) cercano evolutivamente con los roedores.

El cerdo con hábitat y características diferentes presentó un número mayor de MNs comparado con los otros cuatro ungulados aquí reportados.

El bazo se encarga de reconocer eritrocitos (y otras células) con alteraciones, eliminándolos de la circulación, razón por la cual encontramos mayor número de MNs en individuos esplenectomizados. En el presente estudio además de demostrar la presencia de MNs en otras especies de mamíferos, se plantea la posibilidad de utilizar a aquellas especies esplenectomizadas con el mayor número de MNs espontáneos, para ser utilizadas como indicadores de daño genotóxico, con la intención de volver más sensible al individuo.

Después de esplenectomizar un ejemplar hay un aumento en la cantidad de MNs, esto es similar a lo que sucede en pacientes con problemas hematológicos, en los que después de la esplenectomía los micronúcleos (cuerpos de Howell - Jolly) se vuelven característicos de estas personas, no así, en los conejos en los que al parecer el bazo no es el órgano más importante del sistema retículo endotelial encargado de eliminar los eritrocitos dañados.

Al comparar el número de MNs entre el grupo de gerbos esplenectomizados con QC y el grupo de no esplenectomizados con QC, se ve una diferencia, que no resulta significativa estadísticamente, pero que posiblemente al aumentar el tamaño de la muestra pueda volverse evidente.

Con nuestros resultados, podemos plantear la posibilidad de utilizar otros organismos previa esplenectomía, en lugares con sospecha de contaminación como monitores de daño genotóxico, individualizándolos para utilizar a cada uno de ellos como su propio control. Aparentemente existen una variabilidad en el número de MNs en individuos de la misma especie, como se observó en el humano (33), pues encontramos en los gerbos, animales que espontáneamente presentan niveles bajos de MNs y que responden al tratamiento de QC aumentando poco el número de MNs y animales que desde sus niveles basales muestran un número mayor, con una respuesta también mayor al tratamiento.

CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron valores de MNS espontáneos en 16 especies de mamíferos.
- 2.- Las especies con mayor número de MNS fueron el ratón, el gato, el gerbo y el cerdo.
- 3.- El orden con el menor número de MNS fue el de los primates.
- 4.- No encontramos una relación de la eficiencia del bazo y la escala filogenética entre los diferentes grupos aquí estudiados.
- 5.- Entre el grupo control y el grupo de esplenectomizados hay una diferencia, la cual nos da un incremento en la presencia de MNS, como se esperaba al no haber presencia de un sistema de limpieza de la sangre, cosa que no sucedió con los conejos.
- 6.- Al hacer la comparación entre el grupo control y el grupo de no esplenectomizados con QC también hay un aumento de los MNS que nos proporciona una idea de la eficiencia del sistema retículo - endotelial en el que se incluye el bazo.
- 7.- Aunque no fue significativa la diferencia entre el grupo esplenectomizado y no esplenectomizado con tratamiento de QC, se observa un ligero incremento en el número de MNS del grupo de esplenectomizados, el cual podría ser evidenciado con una muestra mayor.

G L O S A R I O

- Aneuploidogénico:** Agentes que agreden al huso mitótico.
- Carcinogénico:** Sustancia que induce cáncer.
- Citóxico:** Agente injuriante a la célula.
- Clastogénico:** Agente o sustancia que daña a los cromosomas.
- Genotóxico:** Compuesto que daña al ácido desoxiribonucleico.
- Mitogénico:** Compuesto que induce la división celular.
- Mutagénico:** Sustancia que incrementa la proporción de mutación induciendo cambios en el ácido desoxiribonucleico.
- Neoplásico:** Crecimiento anormal de una línea celular.
- Oncogénico:** Son genes con la capacidad de transformación de células eucariotas, así mismo puede darse analógicamente un tumor celular.
- Quimioterapéutico:** Medicamento utilizado en terapias antineoplásicas (si bien la palabra quimioterapia puede emplearse al referirse a cualquier medicamento).
- Teratogénico:** Agente que produce o incrementa la incidencia de malformaciones congénitas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Perera, FP., Hemminki, K., Gryzbowska, E., Motykiewicz, G., Michalska, J., Santella, RM., Young, TL., Dickey, C., Brandt-Rauf, P., De Vivo, I., Blaner, W., Tsai, WY., Chorazy, M, Molecular and genetic damage in human from environmental pollution in Poland. *Nature* 360:256-258, 1992.
- 2.- Miguel, AG., Daisey, JM., Sousa, JA, Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with anhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ Mol Mutagen* 15:36-43, 1990.
- 3.- Bowman, WC., Rand, MJ, *Farmacología: bases químicas y patológicas aplicacioones clínicas*, 2a ed, Interamericana, México, D.F. 1984.
- 4.- Schull, WJ, Late radiation responses in man: Current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res* 3:231-239, 1983.
- 5.- Martin, RH., Hildebrand, K., Yamamoto, J., Rademaker, A., Barnes, M., Douglas, G., Arthur, K., Ringrose, T., Brown, IS. An increased frecuency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutation Res* 174:219-225, 1986.
- 6.- Rodríguez-Ariza, A., Nieves, A., Navas, JI., Dorado, G., López-Barea, J., Pueyo, C, Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from spanish coasts. *Environ Mol Mutagen* 19:112-124, 1992.

- 7.- Heddle, JA., Cimino, MC., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, MD., Tucker, JD., Vanparys, PH., Mac Gregor, JT, Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* 18:277-291. 1991.
- 8.- Heddle, JA., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., Mac Gregor, JT., Newell, GW., Salamone, MF, The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental protectin agency gene-tox program. *Mutation Res* 123:61-118, 1983.
- 9.- Schmid W. The micronucleus tests. *Mutation Res* 31:9-15, 1975.
- 10.- Heddle, JA., Lue, CB., Saunder, EF., Benz, RD, Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res* 38:2983-2988, 1978.
- 11.- Hart, JW., Hartley-Asp, B, Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutation res* 120:127-132, 1983.
- 12.- Yamamoto, KI., Kikuchi, Y, A comparasion of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res* 71:127-131, 1980.
- 13.- Herrera, A., Barrueco, C., Caballo, C., De la Peña, E, Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human limphocytes. *Environ Mol Mutagen* 20:218-222, 1992.
- 14.- Tice, RR., Luke, CA., Shelby, MD, Methyl isocyanate: an evaluation of in vivo cytogenetic activy. *Environ Mol Mutagen* 9:37-58, 1987.

- 15.- Shuillin, H., Baker, RSU, Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen* 114:1-5, 1989.
- 16.- Livingston, GK., Reed, RN., Olson, BL., Lockey, JE, Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen* 15:136-144, 1990.
- 17.- Doolittle, DJ., Lee, CK., Ivett, JL., Mirsalis, JC., Riccio, E., Rudd, CJ., Burger, GT., Hayes, W, Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environ Mol Mutagen* 15:93-105, 1990.
- 18.- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R, The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2:11-17, 1987.
- 19.- Schmezer, P., Pool, BL., Lefevre, PA., Callander RD., Ratpan, F., Tinwell, H., Ashby, J, Assay-specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo. *Environ Mol Mutagen* 15:190-197, 1990.
- 20.- Sakahara, H., Ono, K., Saga, T., Akuta, K., Endo, K., Konishi, J., Abe, M, Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmunotherapy assessed by micronucleus assay. *Int J Radiat Biol* 62:443-448, 1992.
- 21.- Ashby, J., Lefevre, PA, Mitogenesis, micronuclei, and carcinogenesis in the rat liver: Some basic inconsistencies. *Environ Mol Mutagen* 20:29-38, 1992.

- 22.- Lähdetie, J, Micronuclei induced during meiosis by ethyl methanesulfonate dimethylbenzanthracene in male rats. Mutation Res 120:257-260, 1983.
- 23.- Russo, A., Levis, AG, Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents: induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. Environ Mol Mutagen 19:125-131, 1992.
- 24.- Trzos,RJ., Petzold, GL., Brunden, MN., Swenberg, JA, The evolution of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. Mutation Res 58:79-86, 1978.
- 25.- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M, The micronuclei assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Res 245:245-249, 1990.
- 26.- Choy, WN., Henika, PR., Willhite, CC., Tarantal, AF, Incorporation of a micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-selenomethionine in nonhuman primates. Environ Mol Mutagen 21:73-80, 1993.
- 27.- Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R, A new micronucleus test usin peripheral blood erythrocytes of the newt Pleurodeles waltl to detect mutagens in fresh-water pollution. Mutation Res 164:245-257, 1986.
- 28.- Bhunya, SP., Jena, GB, Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ -BCH): an in vivo study in chicks. Mutation Res 272:175-181, 1992.

- 29.- Grant, WF., Lee, HG., Logan, DM., Salamone, MF, The use of Tradescantia and Vicia faba bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. Mutation Res 270:53-64, 1992.
- 30.- Corazza, GR., Ginaldi, L., Zoli, G., Frisoni, M., Lalli, G., Gasbarrini, G., Quaglino, D, Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. Clin Lab Hematol 12:269-275, 1990.
- 31.- Williams, WJ., Beutler, E., Ersleu, AJ., Lichtman, MA, Hematology. 21th ed. MacGraw Hill, U.S.A.:308 - 69, 1990.
- 32.- Hillman, RS., Clement, AF., Boggs, DR., Winkelstein, A, Manual de Hematología. 8a ed. Manual Moderno, México, D.F.: 317, 1990.
- 33.- Zuñiga, G, Comparación de número de micronucleos en sangre periférica de pacientes esplenectomizados con y sin quimioterapia citotóxica. Tesis de posgrado, Coordinación General de Investigación y Posgrado, Area Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara, 1993.
- 34.- Sutou, S., Mitui, Y., Toda, S., Sekijima, M., Kawasaki, K., Ando, N., Kawata, T., Abe, S., Iwai, M., Arimura, H, Effect of multiple dosing of phenacetin on micronucleus induction: a supplement to the International and Japanese cooperative studies. Mutation Res 245:11-14, 1990.
- 35.- Krupp, MA., Schoeder, SA., Tierney, LM, Diagnostico Clinico y Tratamiento, 23ed, Manual Moderno, México, D.F: 1212, 1988.