

1989-A

081389705

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



LA OBSERVACION DE MICRONUCLEOS EN LA MUDA DEL

Ambystoma mexicanum ADULTO COMO UN MODELO

PARA DETECTAR AGENTES GENOTOXICOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

SALVADOR WULFRANO RAMIREZ CABA

GUADALAJARA, JAL., FEBRERO DE 1997

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN
EL LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS DE LA DIVISIÓN DE MEDICINA
MOLECULAR
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE OCCIDENTE
C. I. B. O.
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
I M. S. S

BAJO LA DIRECCION DE:
M. EN C. GUILLERMO ZUÑIGA GONZALEZ

Y LA ASESORIA DE:
BIOL. OLIVIA TORRES BUGARIN

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE A:

Victoria Melgoza Cárdenas

Salvador Ramírez Tapia

Elvia Caba de Ramírez

Tomasita Resendez de Caba

Guillermo Zuñiga González

Olivia Torres Bugarín

Ma. de la Paz Ramírez M.

Celia Montaña Dorado

Enrique Fernando Fanti Rodríguez

por sus ánimos y constancia en
impulsarme a lograr esta meta.

DEDICATORIAS

DEDICO ESTE TRABAJO:

A mi Padre Celestial

por su gracia divina.

A mi esposa Vicky y a mis hijos

porque son mi inspiración y júbilo.

A mis padres Salvador y Elvia

por su apoyo y gran ejemplo.

A mis hermanos Gabriel, Hiram, Juan

Manuel, Alejandro, Elvia y Daniel.

por la unidad y amor que nos identifica.

A mi abuelita Tomasita

por su cariño y preocupación

por mi.

A mis mejores amigas Ana Elvira, Celia

y Olivia

porque se, que siempre contare con ustedes

como hasta hoy.

A mis mejores amigos Enrique Fanti,

Porfirio Villaseñor y Marcos Vázquez

por su amistad incondicional permanente.

**A mis compañeros del Grupo C de la
Facultad de Ciencias de la U. de G.
1985-1989 décima generación.**
por la gran unidad, con la que siempre nos
distinguimos, para que nunca se pierda

**Al Ing. J. Jesús Ríos Aguilar.-
Director General de Desarrollo
Urbano y Obras Públicas del
H. Ayuntamiento de Colima.**
Por su apoyo y animo en que lograra
concluir completamente mi carrera

**A mis compañeros de trabajo del
Herpetario del Zoológico Guadalajara
(1989-1993), de la COESE (1993-1995)
y del H. Ayuntamiento de Colima
(1995-1997).**

Por los grandes momentos.

A todos mis familiares y amigos.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL	19
DIAGRAMA DE FLUJO	23
METODOS	26
RESULTADOS	37
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	54

RESUMEN

La prueba de micronúcleos (MNs) sirve para detectar el efecto de agentes clastogénicos (que rompen cromosomas) o aneuploidogénicos (que afectan el uso mitótico), esta prueba es aplicable a todas las células que se dividan.

Un posible modelo para monitorear agentes micronucleogénicos es el *Ambystoma mexicanum*, un organismo que muda de piel de manera espontánea con una frecuencia de hasta 1 cambio de epidermis cada 2.5 días en algunas épocas del año, esto nos indica que la división celular es alta, característica ideal para la utilización de la prueba de micronúcleos. Encontrar MNs en la muda del *Ambystoma mexicanum* de forma espontánea nos da la posibilidad de utilizar este organismo como monitor de agentes micronucleogénicos. Además, este anfibio es de fácil manutención en el laboratorio y de amplia distribución geográfica en el país.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis de la División de Medicina Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del (C.I.B.O.), I.M.S.S. y describe las condiciones de obtención y procesamiento de la muda del *Ambystoma mexicanum* que permitieron lograr la observación de MNs, así como el resultado de un experimento en el que tras el uso de dos inductores de la formación de MNs, se observó un incremento en el número de los mismos.

ANTECEDENTES

El *Ambystoma mexicanum* comúnmente llamado Ajolote, Salamandra o Perrito de agua, fue muy conocido por los Aztecas quienes lo llamaban Axolotl que en náhuatl significa "Juguete de agua"(1); este organismo es un vertebrado de la Clase Anfibia, la cual se divide en seis Ordenes, actualmente sobreviven solo tres, Los Apodos o Gimnifiones (del griego *gymnos* desnudo y *ophis* serpiente) caracterizados por su cuerpo vermiforme y la ausencia de patas, Urodelos o Caudados (Salamandras y Tritones) que poseen cola larga y cuatro miembros iguales jamás adaptados para el salto y los Anuros o Saltadores (Sapos y Ranas) ausentes de cola y con cuatro miembros, de los cuales los posteriores están adaptados para saltar. Aparecieron por lo menos 50 millones de años antes que los reptiles y son los primeros en aventurarse a vivir fuera del agua, sobre la tierra. Se diferencian de los reptiles porque nunca tienen patas con verdaderas garras o una epidermis escamosa (2).

Los Ajolotes se encuentran dentro del orden de los Urodelos en el Suborden Ambystomoidea del cual forma parte la Familia Ambystomidae, ésta comprende al Género *Ambystoma sp* y éste a su vez al *Ambystoma mexicanum* que es la especie de interés para el presente trabajo (3).

El Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) en su estadio larvario (Figura 1), es de color verde oscuro a negro con manchas negras en la parte dorsal del tronco y lados de la cola, con el vientre mas claro, en la base de la cabeza por los costados presenta tres prolongaciones de la piel a manera de penachos de hasta 3 cm. de largo, cada uno de éstos con un fleco rosáceo, se trata de los tres pares de branquias externas de origen tegumentario, por las que respiran en el medio líquido. La cabeza esta aplanada en sentido dorsoventral, con un par de ojos ubicados en la parte anterior de ésta por los costados, no tiene párpados móviles, los orificios nasales se encuentran a los lados y por encima de la boca que es grande y les permite engullir presas voluminosas, la cabeza y el tronco se encuentran unidos por un cuello bien definido, los dos pares de patas son iguales y pequeñas con relación al cuerpo, las anteriores poseen cuatro dedos mientras

que las posteriores tienen cinco, presenta un pliegue cutáneo en la parte dorsal que inicia en la base del tronco y se prolonga hasta la punta de la cola y otro ventral que parte de la base de la cola y se prolonga hasta el final de la misma, ambas le sirven para la natación debido a que en este estadio son de hábitos completamente acuáticos (1). Se alimentan de pececillos, larvas de otros anfibios, así como de insectos (Odonatos, Dípteros, Efemerópteros, etc.) o larvas acuáticas de estos últimos (4), llegando a medir hasta aproximadamente 20 cms. de longitud. Estos organismos presentan una cualidad muy especial que es la de poder reproducirse sin haber alcanzado el estado adulto, lo que se conoce como Neotenia.

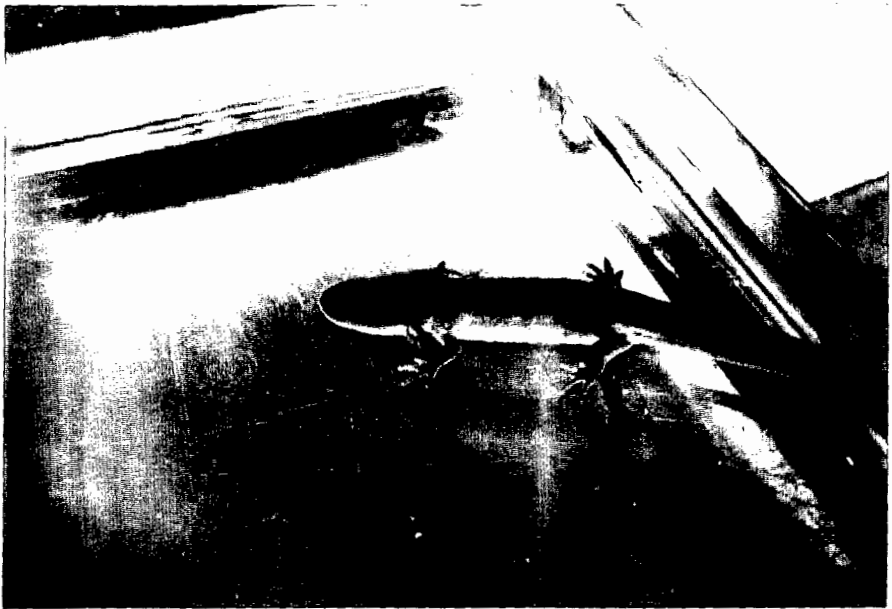


Figura 1: *Ambystoma mexicanum* en su estadio larvario

La metamorfosis del ajolote a su estado adulto es poco frecuente en su medio natural, y está regulada por mecanismos neuroendócrinos, en donde hormonas producidas por la glándula Tiroides son las encargadas de controlar este proceso, ésta a su vez se encuentra

regulada por la hormona estimulante del tiroides o tirotrópina (TSH) de la Hipófisis anterior (5,6).

Existen algunas especies de urodelos, como es el caso del *Ambystoma mexicanum* en los que ciertos individuos presentan una hipófisis "defectuosa" y no libera la TSH en la cantidad suficiente para la realización de este fenómeno con lo que se vuelven animales resistentes a la metamorfosis (5)

La inducción de la metamorfosis en individuos normales puede realizarse como resultado de varios factores, como lo son: a) El incremento de la temperatura del agua por encima de los 20°C, observándose que los cambios metamórficos no se presentan ni en los anuros ni en los urodelos a temperaturas por debajo de los 5°C (5). b) El decremento del nivel del cuerpo de agua a condiciones críticas para la sobrevivencia de las larvas del ajolote y c) La falta de alimento suficiente para su supervivencia (4), por otra parte bajo condiciones de laboratorio la metamorfosis de las larvas del ajolote mexicano puede estimularse tratándolos con tiroxina o con diversos compuestos de yodo. El yodo inorgánico es también eficaz si es implantado por debajo de la piel o en la cavidad peritoneal, de manera que se absorba rápidamente (5,6). El efecto de la temperatura sobre la metamorfosis es en gran parte independiente de la función tiroidea, por lo que otro método eficaz para inducirla en condiciones de laboratorio es el incremento de esta (5).

Al transformarse en adulto (Figura 2) el Ajolote se torna de color negro con pequeños puntos blanco-amarillentos en la parte baja de los costados tanto del cuello como del tronco y cola, la parte ventral se torna gris-blanquecino, las ramificaciones branquiales son reabsorbidas al igual que los pliegues cutáneos dorsal y ventral, los ojos se elevan por encima de la cabeza y el cuello se define plenamente (1), durante este periodo estos organismos logran cierta independencia del medio acuático aún cuando dependerán de habitar en lugares húmedos y frescos para sobrevivir y reproducirse, en esta etapa se alimentan de insectos y gasterópodos, y llegan a medir hasta 13 cms. de longitud.

Son animales que se adaptan bien al cautiverio, con un mínimo de condiciones para su manutención, el récord de vida de *Ambystoma mexicano* en cautiverio es de 25 años (7).

El número cromosómico de la mayoría de los anfibios ya se conoce, y sus cromosomas por su tamaño han sido divididos en macro y micro-cromosomas de manera similar como acontece en las aves, dentro de la Familia Ambystomidae, el género *Ambystoma* tiene el número diploide de 28 cromosomas de los cuales los 14 pares son macrocromosomas (7).

El *Ambystoma mexicanum* se encuentra distribuido geográficamente en cuerpos de agua del Valle de México y Cuenca del Lerma, encontrándose algunos reportes de ellos en el Estado de Jalisco, como es el caso de los colectados en la Presa Nueva de El Molino o Presa del Chilar, en el municipio de Jocotepec, Jal. (1)

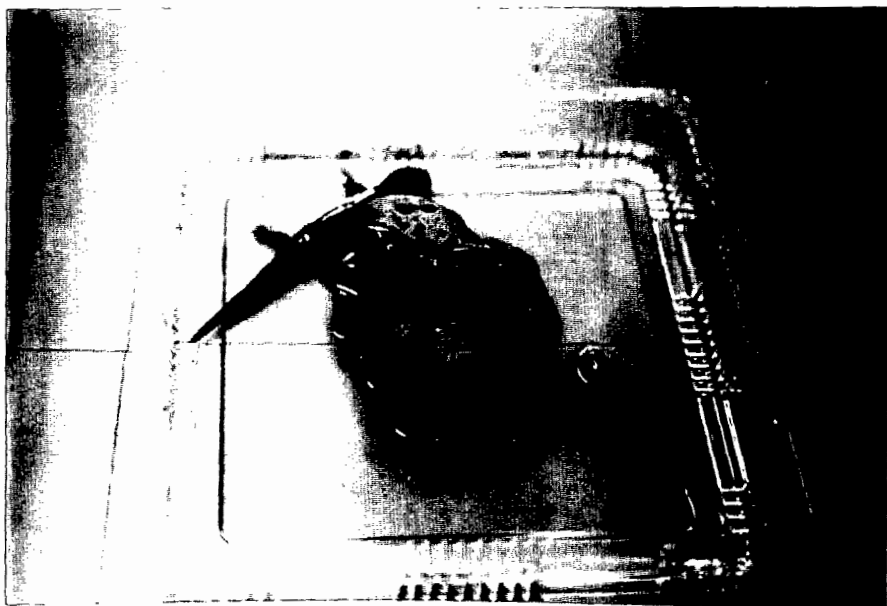


Figura 2: *Ambystoma mexicanum* en estadio adulto.

Historia de los Micronúcleos

Los Micronúcleos (MNs) han sido asociados a daño cromosómico (frecuentemente mencionados desde 1937) y su existencia se ha conocido desde hace muchos años en trabajos relacionados con el campo de la radiación.(8).

El primer reporte sobre los MNs como monitores de daño citogenético fue escrito en 1959, donde se utiliza la frecuencia de MNs para medir el daño citogenético inducido en meristemos apicales de la raíz de plantas irradiadas con neutrones y rayos gama en presencia y ausencia de oxígeno, observando así que los rompimientos de cromátides, cromosomas, isocromátides e intercambios simétricos incompletos y asimétricos, daban origen a fragmentos acéntricos en la mitosis y éstos eran frecuentemente excluidos del núcleo hijo, apareciendo en la siguiente interfase como MNs (8).

Posteriormente entre 1966 y 1970 se propuso el uso de extendidos de médula ósea para detectar in vivo el daño de químicos mutagénicos, demostrando la ocurrencia de MNs en leucocitos en conexión al daño citogenético (8).

Entre 1969-1973 se inician estudios para determinar los parámetros que servirían como los mejores indicadores de daño citogenético en médula ósea in vivo (encuentran MNs en mieloblastos, mielocitos y eritroblastos de médula ósea de animales tratados con químicos mutagénicos). Con esto, los estudios de MNs en leucocitos de médula ósea in vivo se abandonan por presentarse en un bajo porcentaje, no siempre poder contarlos y no distinguirse fácilmente de pequeños lóbulos del núcleo, concluyendo que los eritrocitos policromáticos (EPC) micronucleados era el índice útil para observar el daño citogenético en médula ósea (8,9). Otras investigaciones fueron realizadas, pero es en 1973 cuando los estudios de MNs adquieren importancia histórica por guiar directamente al desarrollo de la prueba in vivo basada en la identificación de MNs en EPC en médula ósea de ratón (8,9,10).

¿Qué son los Micronúcleos?

En hematología los MNs se conocen como cuerpos de ^{Howell} 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 anomalías más características después de la esplenectomía, por lo que su presencia puede indicar un mal funcionamiento del bazo (10-12).

La formación de los MNs se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse al núcleo, ya que 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. Estos son como regla más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de MNs (8) (Figura 3 y 4A). 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 (8,13) (Figura 4B).

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 (14). 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, lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas a períodos cortos de exposición (15,16).

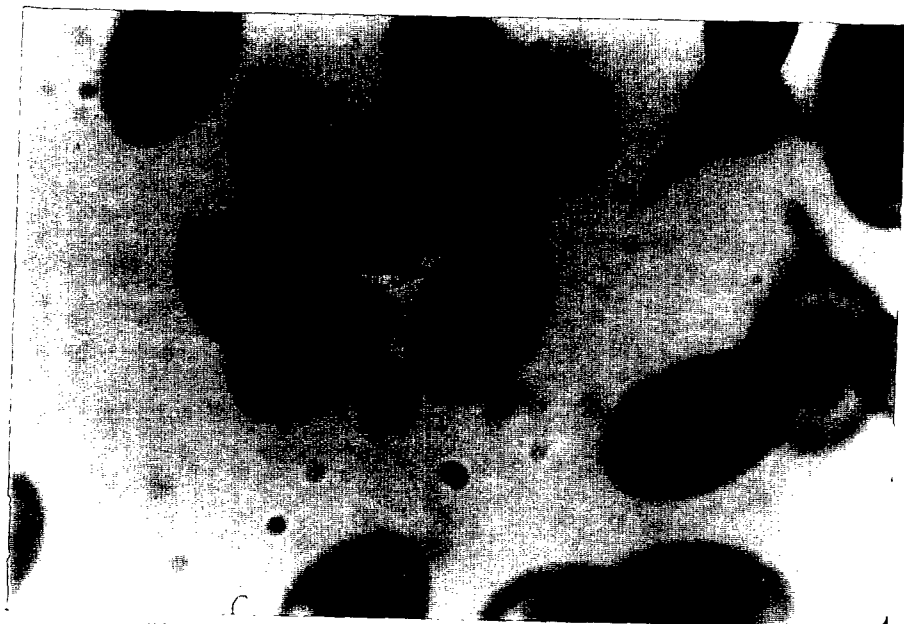


Figura 3 Micronúcleo en célula de sangre periférica de sapo.

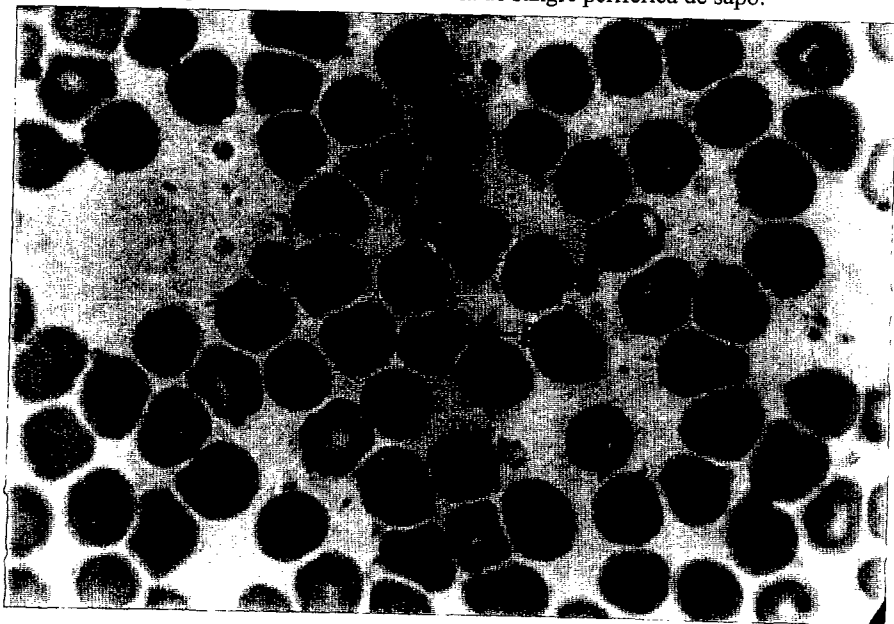


Figura 4. MNs en eritrocitos de hámster por daño al: A.-Cromosoma y B.-Aparato mitótico.

Modelos

Diferentes mamíferos presentan gran variación en las frecuencias espontáneas de MNs, desde 1/309 eritrocitos contados en Ratón (*Mus musculus*) hasta 1/26,666 eritrocitos contados en Mono Vervet (*Cercopithecus aethiops*); observación hecha en un estudio de nuestro laboratorio, razón por la cual en la prueba de MNs se han utilizado animales de laboratorio para los diferentes agentes a probar, los más comunes son rata (17), ratón (14,18), hámster (8) y algunos primates (19,20).

En los últimos años se han propuesto otros organismos como modelos. En los primates como *Macaca mulatta* y *Macaca fascicularis* los estudios se han extendido a la médula ósea de fetos de madres tratadas (20), peces como *Brachidanio rerio* y *Cyprinus carpio* fueron estudiados con resultados negativos (15), sin embargo en *Umbra pygmaea* aunque de restringida distribución geográfica mostró buenos resultados con la exposición de dosis altas de genotóxicos (21). En 1984 se estudia al anfibio *Pleurodeles waltl* (limitado a la península Ibérica y Marruecos), considerado primer modelo de anfibio(15), que fue presentado ya como tal en 1986 describiendo que el uso de larvas de estos anfibios sirve para detectar mutágenos de agua dulce al formar MNs en eritrocitos periféricos, los cuales son muy grandes (30 micrómetros) facilitando la observación de estas estructuras (15). En 1985 es propuesto como modelo el *Xenopus laevis* con el inconveniente de que entre los anfibios es el que presenta los eritrocitos más pequeños (22). Y en 1986 se considera a las larvas de *Ambystoma mexicanum* (15). La *Rana catesbeiana* en 1987 y posteriormente en 1992 la *Rana temporaria* (limitado a Polonia) son sugeridas como otros posibles modelos (21,22), y en 1992 se propuso médula ósea del pollo como modelo demostrando la genotoxicidad del lindano (23). De igual manera las plantas han sido incorporadas al estudio de genotóxicos por medio de la formación de MNs y un limitado número de éstas han sido estudiadas, por ejemplo *Allium sp.* (24), *Chaurasia sp.*, *Vicia faba* (25) y *Tradescantia sp.* (26,27), usando las células formadoras de polen o los meristemos apicales de raíz o tallos (28,29).

Con el afán de hacer más sensible la prueba de MNs, algunos investigadores han utilizado sustancias mitogénicas y/o técnicas quirúrgicas; por un lado administrando eritropoyetina, un factor de crecimiento, multiplicación y diferenciación de los eritroblastos, que se utiliza para inducir eritropoyesis (30) o de manera similar el dicloruro de cobalto que es usado para inducir a la eritropoyetina (31) y por otro lado dentro de las técnicas quirúrgicas, la hepatectomía parcial en la que 2/3 partes del hígado son eliminados, este procedimiento provoca la regeneración del tejido hepático con la consecuente división celular acelerada y la posibilidad de observar hepatocitos micronucleados al ser expuesto el organismo a agentes genotóxicos (32,33,34); y la esplenectomía(17), debido a que el humano esplenectomizado responde a los agentes genotóxicos con la formación de una gran cantidad de MNs visibles en un frotis de sangre periférica, dado que el control que ejercía el bazo sobre la masa de eritrocitos no existe en estas personas, se ha propuesto el estudio de animales esplenectomizados para conocer si su comportamiento es similar al del humano, tal es el caso de un estudio realizado con ratas esplenectomizadas en los cuales como se esperaba, el número de reticulocitos micronucleados aumentó (17).

Debido a la ventaja que presentan los bioensayos para la detección de genotóxicos, diversos grupos de investigadores se han dado a la tarea de buscar organismos que puedan ser utilizados como indicadores. Estos organismos deberán responder a la formación de MNs en número suficiente como para que puedan diferenciarse de organismos tratados y controles.

JUSTIFICACION.

El cada vez mayor 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. El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos, requiere de gran precisión y de un conocimiento amplio del contaminante a verificar. Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas, ya que un organismo dado puede procesar o metabolizar un compuesto cualquiera a su forma tóxica. Por esto pretendemos buscar organismos que sirvan como monitores de contaminantes ambientales con efecto genotóxico a nivel cromosómico mediante la formación de micronúcleos.

Se determinó trabajar con *Ambystoma mexicanum* por varias razones, primeramente por el hecho de que una de las condiciones que favorece la aplicación de la prueba de MNs., es la presencia de tejidos que continuamente se estén dividiendo, como es el caso de las células de los meristemas apicales de la raíz y tallos de las plantas, las células de médula ósea y en este caso las de la epidérmis del Ajolote, ya que en todas éstas se puede observar en periodos de tiempo más cortos, los efectos de los agentes genotóxicos formando MNs.; una segunda razón que determinó el uso de este organismo fue el hecho de presentar una distribución más amplia (a diferencia de otras especies anteriormente probadas o propuestas como modelos para detección de estos agentes) y que incluye al Estado de Jalisco, nos permitirá que de poder observar MNs. en su muda, esta prueba podrá aplicarse para detectar la presencia de dichos agentes en los cuerpos y corrientes de agua de nuestro estado y de otras regiones del país; por ultimo, otra condicionante importante para el uso del Ajolote mexicano en esta investigación fue el interés que se tiene por encontrar este tipo de modelos, pero específicamente los que se desarrollen en el medio acuático dada la creciente preocupación que se ha generado por el aumento en los índices de contaminación de los mares, lagos, lagunas, ríos y arroyos superficiales o subterráneos, así como en los mantos freáticos por diversas sustancias, agentes o elementos entre estos los genotóxicos.

HIPOTESIS

En la muda del *Ambystoma mexicanum* se pueden observar micronúcleos como resultado del daño provocado por exponerlo a agentes genotóxicos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Observar micronúcleos de manera espontánea en la muda del *Ambystoma mexicanum*, y su incremento como consecuencia de exponerlos a agentes genotóxicos.

Objetivos Particulares:

- 1.- Estandarizar las condiciones físicas y biológicas del animal que permitan mantenerlo en condiciones de cautiverio, así como conocer algunos factores determinantes en esta investigación como lo son, el tamaño y estado metamórfico del animal factible para trabajar, las circunstancias bajo las que muda y la frecuencia con la que lo realiza.
- 2.- Estandarizar las condiciones metodológicas bajo las que se registrará este estudio como lo son, la forma de obtención de la muda y las técnicas de fijación y tinción de ésta.
- 3.- Inducir la formación de MNs mediante el uso de sustancias micronucleogénicas conocidas.

MATERIAL

Biológico:

40 ejemplares de *Ambystoma mexicanum*.

Equipo:

- 1 Microscopio fotónico CARL ZEISS con adaptador para cámara fotográfica.
- Cámara fotográfica (CANON AE1).
- Estufa de cultivo (MEDI-LAB).
- Centrífuga (SORVALL GCC-1).
- Potenciómetro (CORNING pH METER 320).
- 3 Peceras de 50x25x30cm.
- 16 Peceras de 30x15x20cm.
- 13 Peceras de 23x12x15cm.
- 1 Anaquel de 2mts x 40cm x 85cm con 7 entrepaños.
- 1 Estuche de disección.
- Portaobjetos (Corning de 25x75mm.).
- Cubreobjetos (Corning de 22x22mm.).
- Estuches para portaobjetos.
- Cajas de Petri.
- Tubos de ensaye.
- Copas de Koplín.
- 12 Cajas de cristal para tinción (Merco de 7.5x9cm.).
- Canastilla de vidrio para tinción.
- Piceta.
- Lápiz marcador de vidrio.
- Papel filtro.
- Cuaderno de registros.

Reactivos:

Arabinosa-C (Alexan o Citarabina) de Farmitalia en solución inyectable.

Colchicina (SIGMA Cat 3915).

Novotiral (MERCK).

Yodo (Isodine).

Colorantes:

Giemsa (SIGMA).

Wright (SIGMA).

Orceína (SIGMA).

Fucsina básica (MERCK).

Verde rápido (SIGMA).

Hematoxilina de Harris (SIGMA).

Orange G (IMSS).

Omnichem Papanicolaou EA-50 (IMSS).

Solventes:

Alcohol Metílico (MERCK).

Alcohol Etilico absoluto (J T BAKER).

Alcohol Etilico del 96 (J T BAKER).

Xilol (SIGMA).

Agua destilada.

Acido Clorhídrico (SIGMA).

Acido acético glacial (SIGMA).

Metabisulfito de Sodio(SIGMA).

Carbón activado (SIGMA).

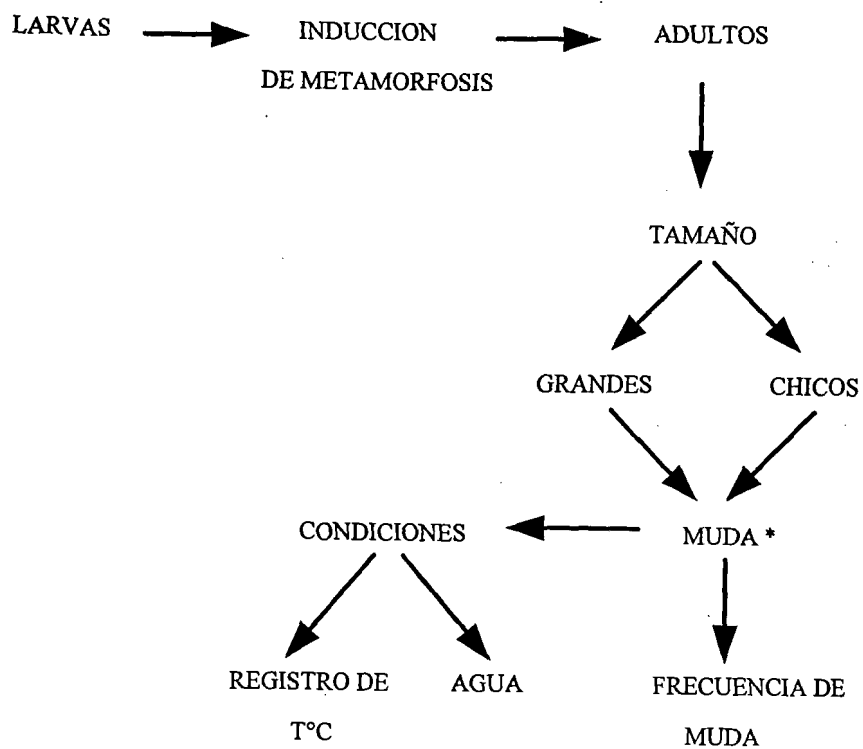
Recina sintética para microscopía (SIGMA).

Aceite de inmersión para microscopía Tipo A (AMSA).

Fosfato monopotásico (Baker).

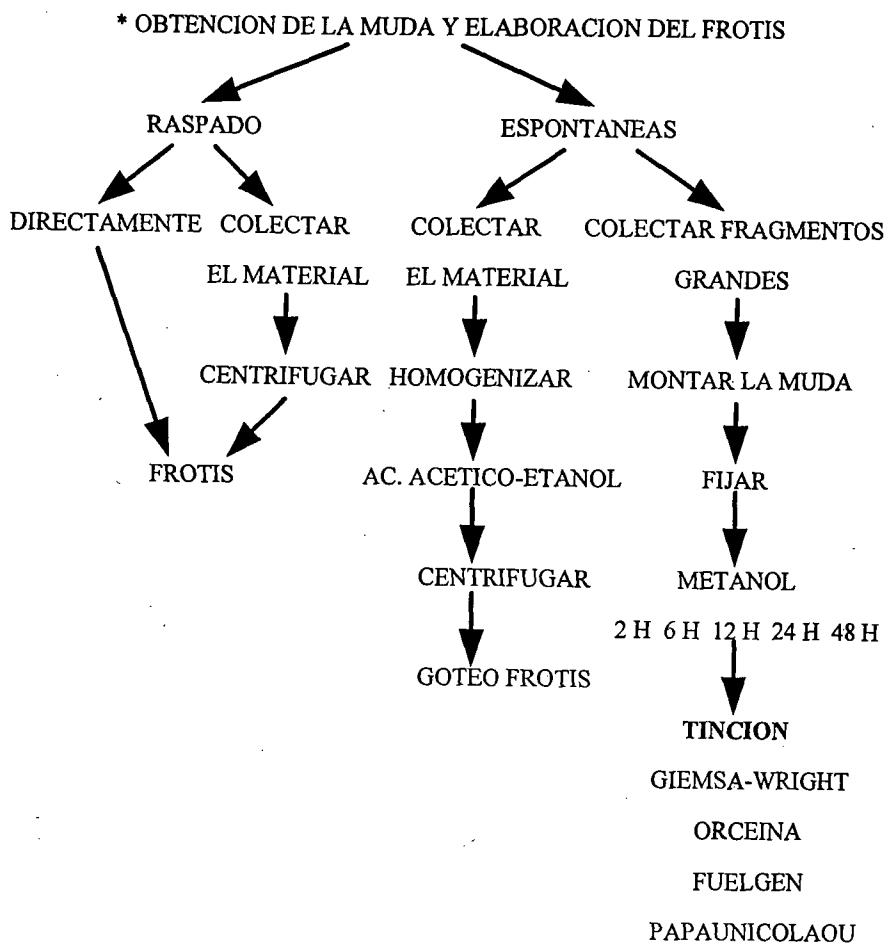
Fosfato disódico anhidro (Baker).

DIAGRAMA DE FLUJO



PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA OBSERVACION
DE MICRONUCLEOS EN LA MUDA DEL

Ambystoma mexicanum



METODOS

Alojamiento.

Los animales ingresaron al laboratorio de Mutagénesis de la División de Medicina Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del I.M.S.S. en estado larvario desde Xochimilco en México, D.F. y se cuarentenaron en peceras de 50 x 25 x 30 cms., una vez concluido este periodo se colocaron dependiendo de su tamaño en peceras de 15x30x20cm con 1 lt. de agua y de 12x23x15 con 500 ml de agua (Figura 5).



Figura 5. Pecera para albergar *Ambystoma mexicanum*.

Las peceras quedaron colocadas en un anaquel de 2 mts x 40cm x 85cm mts., asignándoseles un número y un lugar que fue constante para cada individuo con la

intención de evitar al máximo el estrés y que los animales se acostumbraran a un lugar (Figura 6).

Los periodos de luz oscuridad no fueron controlados puesto que dependieron de la luz del día en el laboratorio y la oscuridad de éste por las noches.

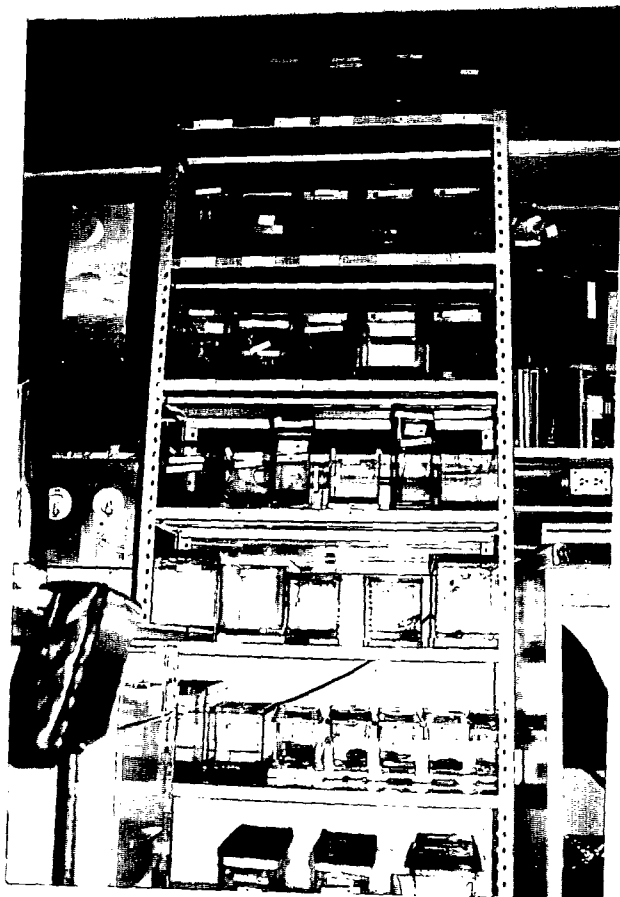


Figura 6. Anaquel para colocación de peceras con Ajolotes.

Cambios de Agua.

El agua se cambió en un principio cada vez que mudaban, luego ésto se efectuó cada 2 días debido a que en ocasiones los periodos de muda de los ajolotes se distanciaban hasta

por 15 días, posteriormente se realizó a diario, con la intención de evitar malos olores y probar si de esta manera se incrementaba el número de mudas, situación que no se dió. En un principio los cambios de agua fueron con agua destilada, sin embargo el agua de la llave funcionó igual y finalmente se optó por esta última por ser mas económica y práctica.

Alimentación

Se probaron tres tipos de alimento: Hígado de res, hígado de rata y jamón de cerdo, de éstos el jamón tuvo una mínima aceptación, además de que rápidamente ensucia el agua por su contenido de grasa y provoca malos olores; por otra parte en el tiempo en el que se utilizó el hígado de res coincidió con la presencia de un periodo de mortalidad, debido a esto ambos alimentos fueron desechados, mientras que el hígado de rata fue el que mejor resultado dió debido a que fue aceptado por la totalidad de los animales sin ningún problema, por lo que se optó por el uso de este alimento.

La alimentación se llevo a cabo dos veces por semana, cortando pequeñas tiras de hígado las que le fueron proporcionadas a cada animal mediante el uso, de unas pinzas, la cantidad de alimento suministrado para cada ejemplar dependió del apetito del mismo ofreciéndole a cada organismo tantas tiras de alimento como éste aceptara.

En las pocas ocasiones en las que los animales dejaban de comer se les suministró el hígado homogeneizado de manera forzada.

Metamorfosis

Debido a que las larvas no mudan, se probó inducir la metamorfosis de las siguientes maneras: se inició por incrementar la temperatura dejando las larvas en agua por arriba de los 20 grados centigrados, con aquellas que no respondieron a este procedimiento, se actuó de otra manera, administrando Yodo como inductor, a través de colocar las larvas en agua con unas gotas de esta substancia. Por último con los pocos animales que no pasaron al estado adulto se optó por la administración de hormonas de tal forma que se les suministró 25 microgramos de levotiroxina y 5 microgramos de liotironina, cada

tercer día durante 10 días por vía oral mezclado con su alimento, la inducción de la metamorfosis se realizó tanto en larvas grandes como en las pequeñas.

Muda

Se observó que las larvas independientemente de su tamaño no mudan, al contrario de los adultos, los cuales lo realizan tanto en su talla pequeña como en la normal (mayor a los 15 cm.).

Los animales variaron la frecuencia de la muda cuando fueron cambiados de su lugar, llegando a suspender ésta hasta por un periodo de 15 días. No se observó incremento en la frecuencia de la muda al cambiar el agua cada vez que mudaban comparado con el cambio diario, pero si fue evidente que la temperatura estacional influyó en este fenómeno, pues los animales mudaron con mayor frecuencia (2.5 días por muda) en la época de calor (primavera, verano y otoño) disminuyendo (4.0 días por muda) al asentarse el frío (invierno).

Estos valores se obtuvieron mediante el cálculo de la media de los datos (fecha de la muda y No. del animal) obtenidos en el lapso del año y que fueron anotados cada vez que se encontraba que un *A. mexicanum* había mudado (Figura 7).



Figura 7. Muda de Ajolote mexicano.

Obtención de la muestra.

Para la obtención de la muestra y a falta de información referente a metodologías aplicables para ésto, se probaron dos métodos diferentes: por raspado y espontáneas.

Se practicó un raspado en la piel del animal mediante el uso de un portaobjetos, una vez obtenido el material se realizaron dos técnicas, en la primera se hizo un extendido de éste sobre otro portaobjetos limpio y desengrasado, mientras que en el segundo todo el material colectado se depositó en un tubo con agua destilada el cual fue centrifugado a 2,500 r.p.m. durante 10 min., realizando el extendido con el precipitado resultante.

En el otro método se tomó un fragmento de muda espontánea y se procedió de dos diferentes maneras, por una parte el fragmento se homogeneizó en ácido acético-etanol 1:3, se centrifugó, el sobrenadante fue retirado agregando una pequeña cantidad de la misma solución para por último gotear ésta sobre un portaobjetos limpio. Por otra parte los fragmentos de muda se colocaron directamente sobre el portaobjetos y se procedió a

su fijación, este último fue el método utilizado, ya que se realizaba más fácil y rápidamente, y permitió una más clara observación y conteo celular al microscópio, debido a que las células continuaban unidas en forma de tejido.

Fijación de la muda

La muda de cada animal fue colocada en una caja de petri con agua destilada (para evitar los residuos de sales) y cortada en fragmentos de 2x1 centímetros, los que se colocaron sobre portaobjetos limpios y desengrasados previamente marcados, extendiendo perfectamente la porción de muda y tratando de eliminar la mayor cantidad de agua de la laminilla para posteriormente dejarla secar en una estufa a 37 grados centígrados. Una vez seca la laminilla se sumergió en metanol al 80% variando los tiempos de 2 a 6 a 12 a 24 y hasta 48 horas (con este último tiempo se evitó que el fragmento de muda se desprendiera de la laminilla en el proceso de la tinción), y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción de la muda

Una vez fijadas y completamente secas se procedió a la tinción de las muestras con las siguientes técnicas: Giemsa-Wright, Feulgen, Orceína y Papanicolaou, cabe mencionar que cada una de éstas estuvieron sujetas a modificaciones, con el objeto de lograr la tinción que permitiera una clara diferenciación del material cromosómico (Núcleo y MNs.) con respecto al citoplasmático, dichas modificaciones se refieren a los cambios en los tiempos de exposición de las laminillas en los colorantes o contratinciones, así como a los incrementos de temperaturas y tiempos de exposición a escarificadores y a enjuagues, especialmente los realizados con alcoholes.

A continuación se describen las técnicas de tinción probadas sin mencionar las modificaciones que sufrieron, dado que en ninguna de éstas permitió la tinción deseada, exceptuando la técnica de Papanicolaou que con las variantes realizadas en ésta se obtuvieron laminillas con la diferenciación deseada, por esto para esta técnica se presentan tanto la metodología convencional como la modificada.

La técnica de Giemsa-Wright utilizada en hematología para las diferenciales leucocitarias, mismo que se utiliza para teñir MNs en sangre, en donde las muestras de la muda del *Ambystoma mexicanum* se tiñen con colorante de Wright por 3 min., se lavan con agua destilada, nuevamente se dejan secar al aire y para concluir son sumergidas en solución de Giemsa (3 ml. del colorante en 50 ml. de buffer de fosfatos pH 6.8) durante 10 min.

La técnica de Feulgen, la cual se utiliza para teñir MNs en mucosa bucal, se realiza sumergiendo las laminillas en HCl 1N a temperatura ambiente por un min., inmediatamente se vuelve a introducir en HCl 1N a 60°C por 10 min., nuevamente las laminillas son colocadas en HCl 1N a temperatura ambiente durante un min., posteriormente se sumergen en reactivo de Schiff durante 90 min., después de esto se enjuagan con agua destilada y se introducen en verde rápido (contratinción) durante 30 seg.

La técnica de Orceína se realiza de la siguiente manera; se sumergen las laminillas en HCl 1N por 8 min. a 60 grados centigrados, se lavan con agua destilada, se sumergen en Orceína a 40 grados centigrados por 20 min., se lavan con etanol, se enjuagan con agua destilada, se realiza la contratinción con verde rápido por 30 seg. y se enjuaga con agua destilada.

En la técnica de Papanicolaou convencional, la muestra se sumerge en Hematoxilina de Harris (tiñe de morado los núcleos) durante 3 a 5 min, se lava con agua corriente caliente y rápidamente se practica otro lavado con alcohol ácido, lavando inmediatamente con agua corriente tibia, luego se sumergen las laminillas en Orange G (tiñe de rosa el citoplasma) por 3 a 5 min. continuando con un lavado con alcohol de 96°, tras éste se vuelven a sumergir pero ahora en Omnicem Papanicolaou EA-50 (tiñe de azul membranas y citoplasma) durante 3 a 5 min. realizando otro lavado en alcohol de 96°, luego se lava en alcohol absoluto, inmediatamente después se pasan las laminillas por

Xilol-Alcohol absoluto (1:1), se pasa 2 veces por Xilol, por último se cubre con resina sintética para microscopía y se coloca el cubreobjetos.

Finalmente la tinción que por su buen resultado se utilizó fue la técnica de Papanicolaou Modificada que se realizó de la manera siguiente:

Las laminillas fueron sumergidas en Hematoxilina de Harris por un periodo de tiempo de 6.5 minutos y posteriormente lavadas con agua corriente caliente.

Sumergir y sacar rápidamente las laminillas en alcohol ácido y volver a lavar en agua corriente tibia.

Tañir con orange G de 3 a 4 segundos y lavar en alcohol al 96%.

Sumergir en colorante EA-50 por 6.5 minutos, lavar con alcohol al 96% y posteriormente con alcohol absoluto.

Pasar las laminillas por alcohol xilol (1:1 volumen a volumen) e inmediatamente por xilol 2 veces.

Cubrir la laminilla con resina sintética para microscopía y se coloca el cubreobjetos.

Observación de micronúcleos

La observación de las laminillas se realizó mediante el uso del Microscopio fotónico utilizando el objetivo 40x (Figura 8) para hacer el conteo de 2,000 células de la muda del *A. mexicanum* y realizar la detección y conteo de los MNs.

En los casos en que se observó en alguno de los campos un micronúcleo, éste se confirmó con el objetivo de inmersión 100x (Figura 9).



Figura 8. Observación de MNs. al microscopio con el objetivo 40x



Figura 9. Observación de MNs. con el objetivo 100x.

Grupo testigo

Con el objeto de determinar la presencia de MNs. en los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* que fueron conseguidos para esta investigación, se tomaron 12 ejemplares adultos, de los que se recabaron 5 mudas por cada uno, éstas fueron fijadas y teñidas, para posteriormente ser observadas al microscopio.

Experimento

Se formaron tres grupos para probar dos inductores. de micronúcleos a tres dosis diferentes (un individuo para cada dosis):

El Grupo No 1 ARABINOSA-C (ARA-C) se les aplicó 6mg/lt, 12mg/lt, 18mg/lt

El Grupo No 2 COLCHICINA (COLCH.) se les aplicó 0.260mg/lt, 0.520mg/lt, 0.780mg/lt

El Grupo No 3 ARA-C+COLCH. la suma de ambas respectivamente.

Se colectaron un mínimo de tres mudas por cada animal.

RESULTADOS

Grupo testigo

Como resultado de la observación de las 60 muestras de cada ejemplar de *Ambystoma mexicanum* del grupo testigo, se constató la ausencia de MNs en la muda de estos ejemplares, a excepción de la muda 2 del ejemplar No. 6 en la que se encontró un Micronúcleo (Cuadro 1).

CUADRO 1

NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS EN LAS MUDAS DE LOS *Ambystoma mexicanum* UTILIZADOS COMO GRUPO TESTIGO.

Ejemplar	Muda 1	Muda 2	Muda 3	Muda 4	Muda 5
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0

Experimento

Este experimento comprueban la hipótesis planteada, que señala que en la muda del *Ambystoma mexicanum* se pueden observar Micronúcleos resultantes del daño provocado por agentes genotóxicos (Figura 10).

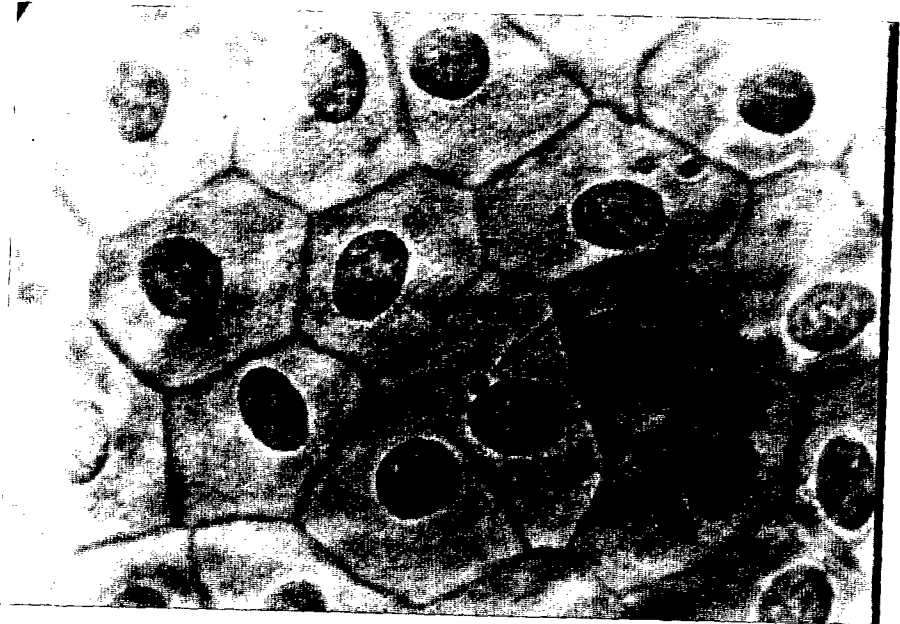


Figura 10. MNs. observados en la muda del *Ambystoma mexicanum* expuesto a los agentes genotóxicos.

Los resultados para cada uno de los grupos sometidos a este experimento son los siguientes (Cuadros 2, 3, 4, 5, 6 y 7)

Grupo No. 1. (Cuadro 2)

Dosis No. 1.

En el Grupo No. 1 (Ara-C) al que se le aplicó la primera dosis no se pudo realizar la observación y conteo de MNs debido a que todas las mudas al desprenderse de este ejemplar quedaron extremadamente destruidas y fue imposible leerlas al microscopio.

Dosis No. 2.

En el caso de la segunda dosis, tanto en la primera como en la segunda muda no se observaron micronúcleos mientras que en la tercera se encontraron un total de 3.

Dosis No. 3.

Por último en la Dosis No. 3 el número de micronúcleos observados en cada una de las 6 mudas colectadas fueron respectivamente los siguientes: 20,8,5,24,11,7.

CUADRO 2

**NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS EN LAS MUDAS
DE LOS *Ambystoma mexicanum* UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO.**

(Grupo No. 1, Dosis diferentes: 3)

	DOSIS 1	DOSIS 2	DOSIS 3
	(6 mg/lt.)	(12 mg/lt.)	(18 mg/lt.)
GRUPO 1			
(Arabinosa-C)	Muda:-----	Muda: 1 2 3	Muda: 1 2 3 4 5 6
	Mns: -----	MNs: 0 0 3	MNs: 20 8 5 24 11 7

Grupo No. 2. (Cuadro 3)**Dosis No. 1.**

Del Grupo No. 2 (Colchicina) expuesto a la primera dosis se obtuvieron 3 mudas, en las cuales no se observó ningún micronúcleo al realizar los conteos sobre éstas.

Dosis No. 2.

En las 3 mudas recabadas del ejemplar al que se le aplicó la segunda dosis se observaron respectivamente 1, 0, 3 micronúcleos.

Dosis No. 3.

Mientras que en el que se expuso a la tercera dosis se contabilizaron 18,15,6,9,6,3 respectivamente para las 6 mudas obtenidas de este animal.

CUADRO 3

**NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS EN LAS MUDAS
DE LOS *Ambystoma mexicanum* UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO.**

(Grupo No.2, Dosis diferentes: 3)

	DOSIS 1 (0.260 mg/lit.)	DOSIS 2 (0.520 mg/lit.)	DOSIS 3 (0.780 mg/lit.)
GRUPO 2			
(Colchicina)	Muda: 1 2 3	Muda: 1 2 3	Muda: 1 2 3 4 5 6
	MNs: 0 0 0	MNs: 1 0 3	MNs: 18 15 6 9 6 3

Grupo No. 3. (Cuadro 4)**Dosis No. 1.**

Por ultimo, del Grupo No. 3 (Ara-C + Colchicina) al que se le aplicó la primera dosis, de un total de 4 mudas colectadas se observaron 0, 0, 3, 0 micronúcleos respectivamente.

Dosis No. 2.

En el caso del ejemplar expuesto a la segunda dosis los micronúcleos contabilizados en las 5 mudas obtenidas fueron respectivamente de 1,3,2,8,3.

Dosis No. 3.

Y al que se trató con la tercera dosis, del cual se colectaron 5 mudas, fueron observados 4,3,1,0,1 micronúcleos respectivamente.

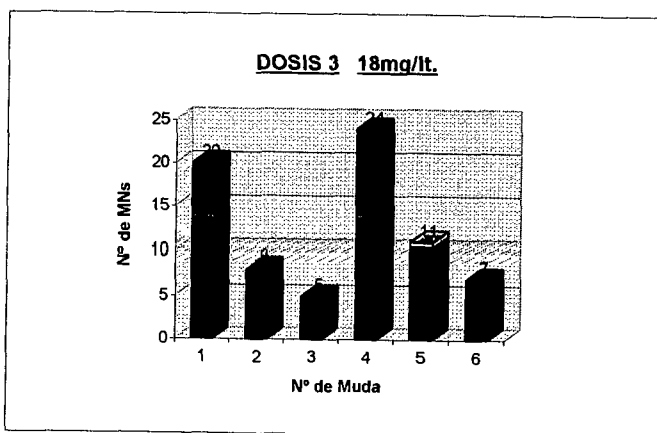
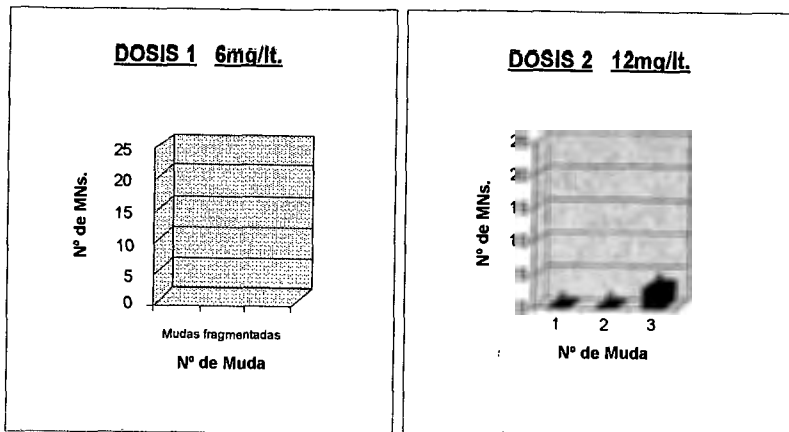
CUADRO 4
NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS EN LAS MUDAS
DE LOS *Ambystoma mexicanum* UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO.

(Grupos No. 3, Dosis diferentes: 3)

	DOSIS 1	DOSIS 2	DOSIS 3
	(6 mg/lt. + 0.260 mg/lt.)	(12 mg/lt. + 0.520 mg/lt.)	(18 mg/lt. + 0.780 mg/lt.)
GRUPO 3			
(Arabinosa-C +	Muda: 1 2 3 4	Muda: 1 2 3 4 5	Muda: 1 2 3 4 5
Colchicina)	MNs: 0 0 3 0	MNs: 1 3 2 8 3	MNs: 4 3 1 0 1

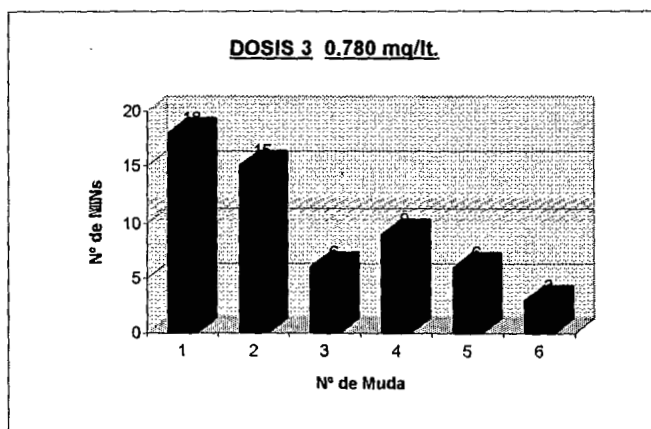
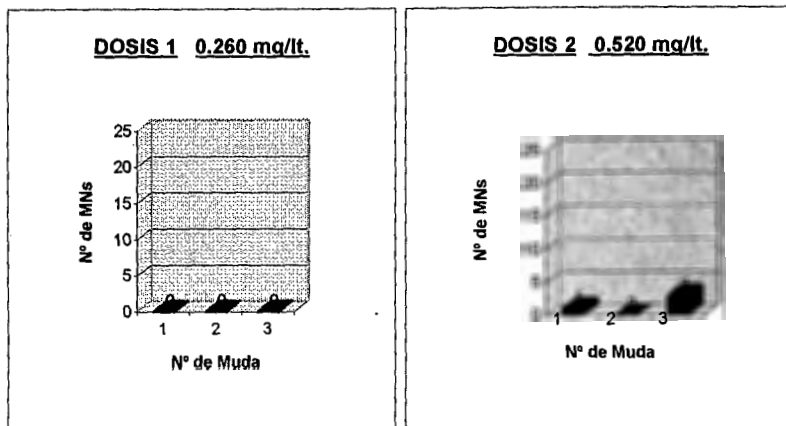
CUADRO 5

**GRAFICAS DEL NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS
EN EL GRUPO 1 EXPUESTO A ARABINOSA-C**



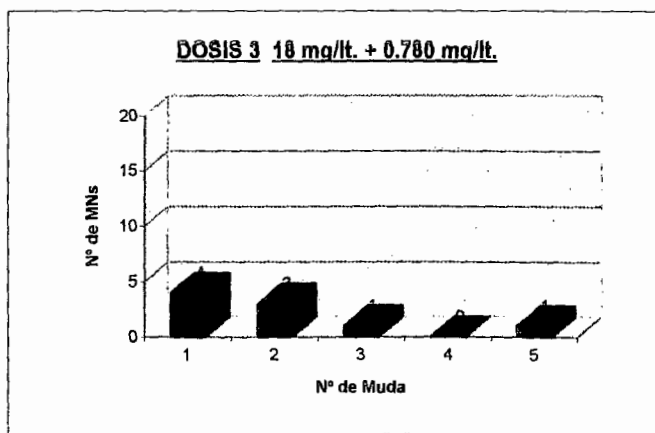
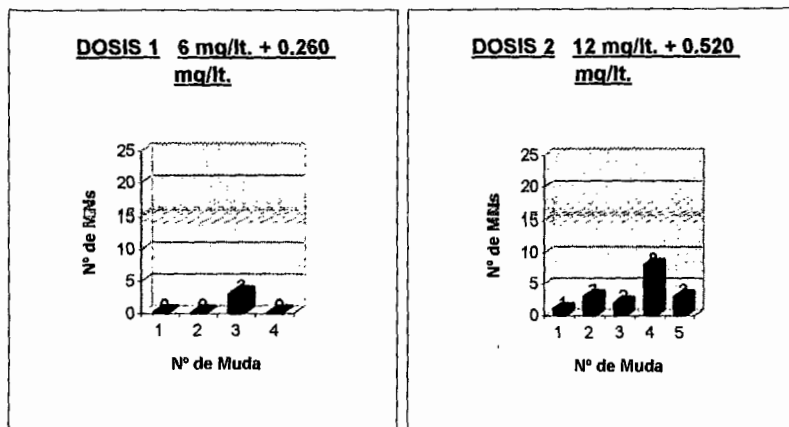
CUADRO 6

**GRAFICAS DEL NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS
EN EL GRUPO 2 EXPUESTO A COLCHICINA**



CUADRO 7

**GRAFICAS DEL NUMERO DE MICRONUCLEOS OBSERVADOS
EN EL GRUPO 3 EXPUESTO A ARABINOSA-C + COLCHICINA**



DISCUSION

Los resultados obtenidos nos demuestran por las observaciones hechas que los animales en el tiempo que se mantuvieron en adaptación tendían a mudar posteriormente al cambio de agua, en base a ésto, al inicio se eligió hacer los cambios de los animales conforme mudaban, posteriormente se decidió por renovar el agua diariamente, pensando en obtener un mayor número de mudas en menos tiempo, lo que no sucedió, sin embargo se identificó un segundo parámetro que resultó de mayor importancia para determinar el tiempo que se da entre un proceso de muda y otro, siendo éste la temperatura, llegando a tener hasta una muda en 2.5 días en la época de calor mientras que en la época de frío ésta solo se obtuvo cada 4 días, ya que en condiciones naturales suelen hibernar en la época de frío, cosa que en nuestro laboratorio no se les permitió, pero seguramente sí disminuyeron su metabolismo y como consecuencia el tiempo entre mudas se alargó.

Respecto al agua utilizada para los cambios, observamos que nos daba el mismo resultado utilizar la destilada y la de la llave, por lo que se optó finalmente por seguir haciendo éstos con la segunda, ya que nos resultó mas económica.

De igual manera en el tiempo de adaptación de los animales a las condiciones de laboratorio se observó que al reubicarlos de lugar los animales se afectaban, llegando a suspender la muda hasta por 15 días, por lo que se eligió mantenerlos en un sólo lugar, escogiendo para ello un anaquel, lugar al que se le puso el número del animal con el fin de regresarlo (después de su alimentación o cambio de agua) a su misma posición y evitar este tipo de estrés que altera al animal.

Con respecto a la alimentación, el hígado fue el mejor aceptado por todos los animales optando finalmente por el de rata para tener un mejor control del alimento, las ratas fueron proporcionaron directamente del Bioterio del C.I.B.O.

Se conocen desde hace mucho tiempo los efectos de las hormonas tiroideas sobre la metamorfosis de los anfibios en general y al menos para la especie aquí estudiada la inducción de ésta no resulto ser un problema, a pesar de que en condiciones naturales el

Ambystoma mexicanum no sufre metamorfosis y se mantiene como larva toda su vida, sin embargo al pasar al estado de cautiverio la temperatura juega un papel importante en el desarrollo de este fenómeno y es así que al dejar a las larvas en agua con una temperatura por arriba de los 20 grados centígrados generalmente éstas empiezan su transformación.

La mayoría de las larvas de *A. mexicanum*. sufrieron la metamorfosis siguiendo este método, sin embargo aquellas que no respondieron al incremento en la temperatura, fueron colocadas en agua con unas gotas de Yodo, el cual es un precursor de las hormonas tiroideas y puede desencadenar este proceso en aquellos animales que resultaron resistentes a la técnica anteriormente realizada.

Por último, los pocos animales que no respondieron ni al incremento de temperatura o a la administración de Yodo se les suministró 25 microgramos de levotiroxina y 5 microgramos de liotironina cada tercer día vía oral mezclado con su alimento, con lo que a los 10 días aprox. del inicio del tratamiento el animal concluyó su metamorfosis, siguiendo estos pasos todos los animales se pueden inducir y así ser utilizados para trabajar con ellos en su estado adulto; esto se puede realizar independientemente de la edad de la larva, por lo que en aquellas jóvenes se pueden tener una metamorfosis precoz con el consiguiente adulto miniatura. Lo que no resultó conveniente fue inducir la metamorfosis de animales muy pequeños, pues éstos por alguna razón desconocida sobrevivieron menos tiempo que los adultos de mayor tamaño, quizá exista algún tipo de inmadurez en los animales muy pequeños que no se alcance a corregir al inducir su metamorfosis. Debido a esto en el laboratorio se trabajó con adultos normales, esto es, con aquellos provenientes de la metamorfosis inducida en larvas de tallas superiores a los 15 cm.

Raspar a los animales para la obtención de la muestra no resultó ser lo mas conveniente, debido a que la cantidad de material obtenido no es suficiente y éste en la mayoría de las ocasiones se encuentra inmerso en una substancia viscosa que se desprende de la

epidermis del animal al momento del raspado, por otra parte la manipulación del animal es mucho mayor y se le puede provocar daño. Se probó hacer homogeneizados de muda fijando con etanol-ácido acético en volumen de 3 a 1 respectivamente y goteando éste sobre portaobjetos limpios, pero las células quedaban muy dañadas; finalmente se optó por la obtención de la muda cuando el Ajolote se desprendía de ésta, tomando fragmentos de la misma y fijándolos con metanol al 80%.

El procesado de la muda se trabajó por ensayo y error, variando el tiempo de fijación, las mudas con menos tiempo en el metanol se desprendieron al momento de la tinción, encontrando que el tiempo optimo de fijación fue 48 h. Se ensayó el alcohol al 80% por ser la concentración con la que se fijan las células de la mucosa bucal que fue el tejido mas parecido.

En la tinción se probaron varias técnicas, se inició con el método de Feulgen (a base de Fucsina Básica) y el de Orceína, que son empleadas para teñir epitelios, sin buenos resultados; también se utilizó Giemsa empleada en la rutina hematológica convencional y técnicas citogenéticas, pero tampoco resultó y por último la tinción de Papanicolaou descrita en los resultados nos dió la coloración apropiada.

Durante el desarrollo de la investigación, en la época de calor varios de los ejemplares enfermaron, presentándose en éstos una cubierta de tipo mucilaginososa o algodonosa de color blanquecino en el exterior de su cuerpo, llegando algunos a morir, dadas las características de la enfermedad se supuso que se trataba de hongos; debido a esto fueron tomadas varias muestras de esta cubierta, de las cuales se hicieron cultivos determinándose que no eran dichos organismos como se había supuesto, y a pesar de que no se pudo determinar el tipo de patógeno que los infectó, se probó administrarles una mezcla de 2 antibióticos en el agua (200 microlitros de la mezcla de Gentamicina de 80 mg/2ml y Penicilina 800,000 u/2ml en cada litro de agua) con buenos resultados.

Con el experimento piloto pudimos observar que sí es posible realizar la inducción de micronúcleos a través de la exposición de los ejemplares a agentes genotóxicos, ya que

obtuvimos incrementos en el número de MNs de 0 hasta 24 en 2000 células contadas, nos llama la atención el haber encontrado en este experimento dos incrementos en el caso del Grupo 1, dosis 3 en el que en la primera muda se obtuvieron 20 MNs y en la tercera muda 24 después de haberse manifestado un descenso hasta 8 MNs en la segunda muda, lo que también sucedió en el grupo 2, dosis 3 en el que la primera muda presentó 18 MNs, la segunda 15, luego la tercera 6 y volvió a incrementar a 9 MNs en la cuarta muda, con lo que también se observa un desfase en el número de muda en la que apareció el mayor número de MNs, lo que lleva a especular lo siguiente:

La existencia de una doble capa germinativa que en el momento de la exposición del organismo al agente genotóxico se ven afectadas tanto la mas externa como la interna y que al presentarse la muda exterior manifiesta el primer incremento que disminuye hasta la aparición de la capa interna con lo que se vuelve a elevar el número de micronúcleos.

Por otra parte podemos suponer que se trata de una diferencia en el número de capas de la piel del *Ambystoma mexicanum* en las diferentes partes de su cuerpo, esto es, que la capa germinativa del animal se ve afectada por el agente genotóxico y aflora a la superficie mas rápido y con un menor número de mudas en aquellas zonas donde existen menos capas y que surgirá mas tarde en donde existe un mayor número de éstas y a su vez en un número mayor de mudas. Con ésto se quiere decir que la obtención y observación del fragmento de muda el cual tomamos al azar, podría coincidir o no con la salida de la capa afectada por el agente empleado y esto nos daría la impresión de desfases en la salida de la porción de piel con MNs., así mismo como consecuencia se puede dejar de ver el incremento de MNs, o como en este caso verlo duplicado.

Otra suposición podría ser que se observe un efecto de los inductores a nivel local primeramente y un segundo efecto que estuviera determinado por el inductor bebido del agua en la que el animal se encuentra contenido.

En base a los resultados encontrados el grupo 3 de Ara-C + Colchicina, sería de esperar el mayor incremento de MNs, sin embargo fue el grupo que obtuvo el menor número de éstos con lo que se puede pensar que para la afinación del modelo será importante el realizar mas experimentos en los que por un lado se tomen las mudas marcando la laminilla para identificar la parte anatómica del animal de donde se tomó el fragmento de piel, con lo que posiblemente se pueda dilucidar si existen diferentes grosores en las capas de piel dependiendo de la parte del cuerpo de que se trate.

Se deberá probar la respuesta a estos inductores comparando la administración de éstos en el agua contra la administración vía intraperitoneal con lo que podremos determinar si la piel puede tener la facultad de seleccionar los agentes que se prueben, y por último se podría probar el efecto de radiaciones ionizantes que no dejarían la menor duda de la penetración y distribución de éstas

Es importante hacer notar que en ambos casos; el de la exposición de los animales a un agente clastogénico como la Arabinosa-C o a un aneuploidogénico como la Colchicina, se obtuvo MNs, con lo que el modelo puede detectar los agentes productores de MNs que presentan los mecanismos de acción mas comunes y a su vez funciona de la misma manera como lo hacen otros reportados en la literatura.

La muda del *Ambystoma mexicanum* como modelo para la detección de agentes genotóxicos ha resultado ser una técnica que a diferencia de otras propuestas anteriormente para urodelos (15) no es agresiva ni invasiva, ya que no se requiere de sacrificar al organismo para obtener la muestra para la observación de MNs como resultado de daño citogenético provocado por éstos agentes, sino que en este caso, la muestra se obtiene de un proceso natural como lo es el de la muda de los ejemplares adultos de esta especie, sin llegar a sufrir ningún tipo de afectación física.

CONCLUSIONES

El *Ambystoma mexicanum* puede ser un modelo para la detección de agentes genotóxicos mediante la prueba aquí propuesta, ya que presenta las siguientes ventajas:

- 1.- Este organismo puede ser mantenido en cautiverio sin grandes dificultades y por su pequeño tamaño permite un fácil manejo para ser transportado de un lugar a otro.
- 2.- Aún cuando se obtenga como larva, puede ser inducido al estado adulto por diversos métodos, mismos que se describen en el presente trabajo.
- 3.- En condiciones de cautiverio muda con gran frecuencia (cada 2 a 4 días), especialmente a temperaturas por arriba de los 20 grados centígrados.
- 4.- Sus MNs pueden ser observados fácil y claramente en la muda por su tamaño, con el simple uso de un microscopio fotónico con los objetivos 40x o 100x.

La metodología descrita en este trabajo no es agresiva para los ejemplares utilizados, ya que la muestra se obtiene de un proceso natural como lo es el de muda.

Se sugiere para futuros experimentos anotar la parte del cuerpo de donde procedió la fracción de muda utilizada como muestra, así mismo el uso de inductores administrados por vía intraperitoneal y exponer a los animales a radiaciones ionizantes para tratar de dilucidar los puntos tratados en la discusión así como el hacer estudios de Dosis-Respuesta para determinar la sensibilidad del modelo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Camarena K. F. , 1974. Salamandros de la "Presa Nueva" de El Molino o "Presa del Chilar", Municipio de Jocotepec, Jal.Boletín de la Sociedad de Ciencias Naturales de Jalisco, A.C. 7:16-24.
- 2.- Zim H.S., Smith H.M., 1994. Reptiles y anfibios. Ed Trillas.México, 168
- 3.- Alvarez del Villar J. Los Cordados. Ed. C.E.C.S.A. ed. 1ª, México. 129-149.
- 4.- Experiencia personal en el trabajo con esta especie y otras de anfibios y reptiles en el Herpetario del Zoológico Guadalajara durante el periodo de 1989-1993.
- 5.- Donnell C., 1967. Endocrinología General., Ed. Interamericana, S.A. ed. 4ª,México. 208-214.
- 6.- Barrington E.J.W., 1977. Introducción a la Endocrinología General y Comparada. Blume Ediciones. ed. 1ª española, España. 201-204.
- 7.- Duellman W.E., Trueb L., 1994. Biology of Amphibians. Ed Johns Hopkins University Press. U.S.A. 670.
- 8.- Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J.T., Newell G.W., Salomone M.F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity A Report of the U.S. Enviromental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res 123:61-118.
- 9.- Von Ledebur M., Schmid W., 1973. The micronucleus test methodological aspects, Mutation Res. 19:109-117.
- 10.- Schimid W., 1975. The micronucleus tests. Mutation Res 31:9-15.
- 11.- Corazza G.R., Ginaldi L., Zoli G., Frisoni M., Lalli G., Gasbarrini G., Quaglino D., 1990. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function a reassessment. Clin Lab Hemaol 12:269-275.
- 12.- Erslev A. J., Beutler E., 1995. Production and destruction of erythrocytes. In Williams W.J., Beutler E., Lichtman M.A. and Coller B. S. ed. Hematology. 5ª ed. USA: MacGraw-Hill, Inc, 425-441.

- 13.- Yamamoto K.I., Kikuchi Y., 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res* 71:127-131.
- 14.- Hart J.W., Hartley-Asp B. 1983. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutation Res* 120:127-132.
- 15.- Jaylet A., Deparis P., Ferrier V., Grinfeld S., Siboulet R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res* 164:245-257.
- 16.- Hillman R.S., Clement A.F., Boggs D.R., Winkelstein A., 1990. Manual de hematología. 8ª reimpresión, México, D.F: Manual moderno, 317.
- 17.- Hayashi M., Kodama Y., Awogi T Suzuki T., Asita A.O., Sofuni T. 1992. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats *Mutation Res.* 278:209-213.
- 18.- Kliesch U., Adler I.-D., 1992. Sex differences in micronucleus inductions with hycanthone methanesulfonate in bone marrow cells of mice. *Mutation Res* 283:249-253.
- 19.- Nang W.C., Willhite C.C., 1989. Primate Micronucleus study of L-Selenomethionine. *Environ Mol Mutagen* 14:123-125.
- 20.- Choy W.N., Henika P.R. Willhite C.C., Tarantal A.F., 1993. Incorporation of a micronucleus study into a the developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-selenomethionine in nonhuman primates. *Environ Mol Mutagen* 21:73-80.
- 21.- Krauter P.W., Anderson S.L., Harrison F.L., 1987. Radiation induced micronuclei in peripheral erythrocytes of *Rana catesbeiana*: An aquatic animal model for in vivo genotoxicity studies. *Environ Mol Mutagen* 10:285-286.
- 22.- Rudek Z., Rozek M., 1992. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* y *Xenopus laevis* by the pyrethroid fastac 10 EC. *Mutation Res* 298:25-29.

- 23.- Bhunya S.P., Jena G.B., 1992. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ -BCH)an in vivo study in chicks. *Mutations Res* 272:175-181.
- 24.- Fiskesjö G., 1981. Benzo(a)pyrene and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test, *Hereditas* 95:155-162.
- 25.- De Marco A., De Simone C., Raglione M., Testa A., Trinca S., 1992. Inportance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of *Vicia faba* treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide, *Mutation Res* 279:9-13.
- 26.- Ma TH., 1990. *Tradescantia*-Micronucleus test on clastogens and in situ monitoring, *Mutation and the Environment*, Part E, Wiley-Liss, New York, 83-90.
- 27.- Ruiz E.F.; Rabago V.M.E., Lecona S.U., Pérez A.B., Ma TH., 1992. *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring, *Mutation Res* 270:45-51.
- 28.- Grant W.F., Lee H.G., Logan D.M., Salamone M.F., 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Res* 270:53-64.
- 29.- Ramulu K.S., Dijkhuis P., Famalaer I., Cardi T., Verhoeven H.A., 1994. Cremart: A new chemical for efficient induction of micronuclei in cells and protoplasts for partial genome transfer, *Plant Cell Reports* 13:687-691.
- 30.- Suzuki Y., Nagae Y., Ishicawa T., Watanabe Y., Nagashima T., Matsukubo K., Shimizu H., 1989. Effect of Erythropoietin on the Micronucleus Test, *Environ Mol Mutagen* 13:314-318.
- 31.- Suzuki Y., Shimizu H., Nagae Y., Fukumoto M., Okonogi H., Kadokura M., 1993. Micronucleus Test and Erythropoiesis: Effect of Cobalt on the Induction of Micronuclei by Mutagens. *Environ Mol Mutagen* 22:101-106.

- 32.- Schmezer P., Pool B.L., Lefevre P.A., Callande R.D., Ratpan F., Tinwell H., Ashby J., 1990. Assay-specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo. *Environ Mol Mutagen* 15:190-197.
- 33.- Sakahara H., Ono K., Saga T., Akuta K., Endo K., Konishi J., Abe M., 1992. Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmunotherapy assessed by micronucleus assay. *Int J. Radiat Biol* 62:443-448.
- 34.- Ashby J., Lefevre P.A., 1992. Mitogenesis, micronuclei, and carcinogenesis in the rat liver: Some basic inconsistencies. *Environ Mol Mutagen* 20:29-38.



Centro Universitaria de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales
Biología

1033/95

C. SALVADOR W. RAMIREZ CABA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "LA OBSERVACION DE MICRONUCLEOS EN LA MUDA DEL Ambystoma mexicanum ADULTO COMO UN MODELO PARA DETECTAR AGENTES GENOTOXICOS", para obtener la Licenciatura en Biología.

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

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

Las agujas, Zapopan, Jal., 27 de Julio de 1995
EL DIRECTOR

M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO

OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

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

AEIR/SVM/mahs.

C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
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:

SALVADOR WULFRANO RAMIREZ CABA

código 081389705 con el título:

LA OBSERVACION DE MICRONUCLEOS EN LA MUDA DEL *Ambystoma mexicanum*
ADULTO COMO UN MODELO PARA DETECTAR AGENTES GENOTOXICOS.

consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración
el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de
exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva
dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

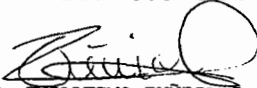
ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., de 199 .


a 25 de febrero de 1997 .

EL DIRECTOR DE TESIS

EL ASESOR


M.C. GUILLERMO ZUÑIGA G.

NOMBRE Y FIRMA



BIOL. OLIVIA TORRES BUGARIN

NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

1. M.C. CARLOS ALVAREZ MOYA

Nombre completo


Firma

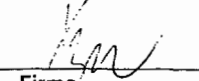
2. M.C. MA. CRUZ ARRIAGA RUIZ

Nombre completo


Firma

3. DRA. GALINA ZATSEVA PEIROVA

Nombre completo


Firma