

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales



Ambystoma sp.: nuevo modelo para la prueba de micronúcleos.-

Tesis Profesional

Que Para Obtener el Título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta:

María del Carmen Raigosa Hernández.-

Las Aguas, Zapopan, Jalisco, Noviembre 2002

189757 / 022862
B753
ej 1

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Biológicas y Ambientales



Ambystoma sp.: nuevo modelo para la prueba de micronúcleos.-

Tesis Profesional

Que Para Obtener el Título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta:

María del Carmen Raigosa Hernández.-

Director:

M. en C. Ana Lourdes Zamora Perez.-

Asesor:

M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda.-

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Noviembre 2002



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. MARÍA DEL CARMEN RAIGOSA HERNÁNDEZ
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES opción Tesis** con el título "**Ambystoma sp.: NUEVO MODELO PARA LA PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **BIOL. ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ** y como Asesor el/la **M.C. BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA** y el **DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**.

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

**"2002, Año Constanco Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 01 de octubre del 2002**



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

- c.c.p. BIOL. ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ. Director del Trabajo.
- c.c.p. M.C. BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA.- Asesor del Trabajo
- c.c.p. DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA.- Asesor del Trabajo
- c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam



Forma C

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

BIBLIOTECA CENTRAL

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante: **María del Carmen Raigosa Hernández**, con el título: **Ambystoma sp.: Nuevo Modelo para la Prueba de Micronúcleos**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, 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 sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., 30 de Octubre del 2002

El Director del Trabajo

Biol. Ana Lourdes Zamora Pérez
Nombre y Firma

El Asesor Interno

Dr. en C. Carlos Álvarez Moya
Nombre y Firma

El Asesor Externo

M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda
Nombre y Firma



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

Sinodales

1.- **Dra. en C. Alma Rosa Villalobos Arámbula**

Nombre Completo

Firma

2.- **M. en C. Eduardo Vázquez Valls**

Nombre Completo

Firma

4.- **M.V.Z. Alberto Ramos Mora**

Nombre Completo

Firma

5.- **Dr. en C. Carlos Álvarez Moya (Suplente)**

Nombre Completo

Firma

Ambystoma sp.: nuevo modelo
para la prueba de micronúcleos.-

Este Trabajo se Realizó en el :

Laboratorio de Mutagénesis.-

Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Instituto Mexicano del Seguro Social.

Colaboradores.-

M. en C. María Luisa Ramos Ibarra.-

Biol. Cecilia Margarita Batista González.-

Dr. en C. Guillermo Zúñiga González.-

Agradecimientos.-

Toda la vida he agradecido a mis padres por haberme dado la existencia y brindarme la oportunidad, con su amor y dedicación de llegar a lograr mi más grande anhelo de realizarme como Lic. en Biología, así como a mis hermanos quienes con gran cariño me han alentado.

Agradezco a la Universidad de Guadalajara, mi alma mater, mi más grande orgullo, donde logre la realización de mis ideales al recibir los conocimientos y experiencias de sabios maestros.

En forma especial agradezco: a la M. en C. Ana Lourdes Zamora Perez, por su ayuda incondicional para la realización de esta tesis.

Al Dr. en C. Guillermo Zúñiga González, por las facilidades que me brindó para realizar la presente investigación.

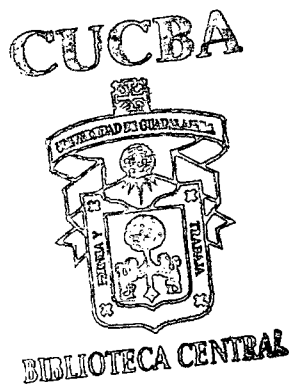
A la M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda, por su asesoría y enseñanza.

A la M. en C. María Luisa Ramos Ibarra, por brindarme su orientación y buenos consejos.

A la Biol. Cecilia Margarita Batista González, por su colaboración en la elaboración de ésta tesis.

Índice.-

Resumen.-	1
Antecedentes.-	4
✧ Prueba de Micronúcleos.	6
✧ Ventajas y Desventajas de la Prueba de Micronúcleos.	8
✧ Agentes Micronucleogénicos.	9
✧ Los Urodolos.	11
Planteamiento del Problema.-	18
Hipótesis.-	20
Objetivos.-	22
✧ General.	23
✧ Particulares.	23
Material y Métodos.-	24
✧ Selección de Organismos.	25
✧ Manejo de Animales.	25
✧ Inducción de Células Micronucleadas.	25
✧ Definición de Variables.	27
✧ Criterios de Inclusión.	27
✧ Criterios de Exclusión.	27
✧ Análisis Estadístico.	28
✧ Ética.	28
✧ Diseño.	28
✧ Diagrama de Flujo.	29
Resultados.-	30
Discusión.-	34
Conclusiones.-	41
Bibliografía.-	43
Glosario.-	50
Anexos.-	53
✧ Anexo A: Preparación y Análisis de las Muestras.	54



Figuras.-

1.- Formación de Micronúcleos.	7
2.- Células Micronucleadas de Diferentes Tejidos.	9
3.- Colchicina.	10
4.- Mecanismo de Acción de la Colchicina.	10
5.- Eritrocitos de Sangre Periférica.	11
6.- Formas Extintas y Vivientes de los Anfibios.	12
7.- Diagrama de la Piel de Anfibio.	13
8.- Muda de Urodelo.	14
9.- Ciclo de Vida de los Urodelos.	15
10.- Ambystoma.	16
11.- Células de la muda del <i>Ambystoma sp.</i>	27
12.- Células Micranucleadas de la Muda del <i>Ambystoma sp.</i>	37
13.- Micronúcleo Inducido por Colchicina.	37

Cuadros.-

I.- Dosis y Tiempo de Exposición a Colchicina en los Diferentes Grupos.	26
II.- Promedio y Desviación Estándar de Células Micronucleadas de la Muda del <i>Ambystoma sp.</i> , en los Diferentes Grupos.	32

Gráficas.-

1.- Promedio y Desviación Estándar de CMN del Grupo 1.	33
2.- Promedio y Desviación Estándar de CMN del Grupo 2.	33

Resumen.-

El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos requiere de gran precisión y conocimiento amplio del contaminante a verificar; además, su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas ya que un organismo vivo puede procesar o metabolizar un compuesto a su forma tóxica.

La prueba de micronúcleos (MN) detecta el efecto de agentes genotóxicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo forman éstas estructuras. La prueba permite detectar agentes clastógenos y aneuploidógenos, pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN, además esta prueba es aplicable a todos los tejidos que se dividan. El *Ambystoma sp.*, muda su piel de manera espontánea cada 2.5 días, característica ideal para la prueba de MN.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar al *Ambystoma sp.*, como bioindicador de compuestos genotóxicos mediante el conteo de células micronucleadas (CMN) en su muda. Se indujo la formación de CMN con colchicina, agente aneuploidógeno, para observar si existe incremento de CMN.

Los fragmentos de muda se colocaron sobre portaobjetos, se fijaron y se tiñeron con la tinción rápida Grifols. La observación de las muestras se realizó mediante microscopio de luz con el objetivo 100x y se registraron las CMN en 2,000 células. Los resultados se compararon por medio de la prueba T - de Student.

El valor basal de CMN del *Ambystoma sp.*, es de 0.45 ± 0.88 CMN/2,000 células. Se observó incremento significativo al comparar los valores de la muda basal contra los valores de las siguientes 5 mudas de CMN al administrar 0.774 mg de colchicina por 5 días.

Con base en estos resultados proponemos al *Ambystoma sp.*, como un nuevo modelo de laboratorio para determinar genotóxicos básicamente micronucleogénicos, mediante el conteo de CMN en su muda, sin la necesidad del sacrificio del animal para obtener la muestra.

Antecedentes.-



La contaminación en diferentes ciudades del mundo ha sido asociada con incremento en el riesgo de contraer cáncer ¹. Varias actividades humanas aumentan la contaminación; agentes físicos, como las radiaciones pueden ocasionar daño celular y mutaciones ^{2,3}; otros químicos, como los residuos de las minas, pesticidas y desechos urbanos, pueden afectar ecosistemas marinos y subsecuentemente, dañar al hombre a través de cadenas tróficas ⁴. Extractos de partículas llevadas por el viento pueden producir tumores en ratones y existen evidencias que sugieren que el desarrollo de tumores es un proceso de múltiples etapas que inicia con una mutación ⁵.

Numerosos químicos del medio ambiente e industriales, así como la administración de fármacos, producen daño genético en animales experimentales con resultados consistentes, este potencial para efectos similares en el humano debe ser considerado ⁷.

Un primer paso para evitar el incremento del daño ecológico es impedir la liberación de sustancias tóxicas al medio ambiente, mismas que pueden ser detectadas con organismos indicadores ⁴. El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos requiere de gran precisión y conocimiento amplio del contaminante a verificar; esto es, se debe saber previamente qué tipo de compuestos se van a medir, con la intención de utilizar los estándares y equipo adecuados, además su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas ya que un organismo vivo puede procesar o metabolizar un compuesto a su forma tóxica ⁴. Muchas sustancias mutagénicas u oncogénicas deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado ⁵, por lo que cualquier prueba *in vitro* debe incluir un sistema de activación metabólica del compuesto original mediante una preparación de microsomas de hígado ⁵.

En toxicología genética se acepta que una sola prueba no puede detectar con exactitud o predecir con confiabilidad los efectos genotóxicos de una sustancia en el humano ⁹, por lo que es importante tener diversas alternativas de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para probar genotóxicos.

Actualmente se conocen pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos, éstas pueden ser bioquímicas, se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, con micro o macro organismos, pueden determinar daño microscópico (pruebas citogenéticas) o a nivel molecular, como se logra al estudiar algunos polimorfismos génicos que se sabe se asocian con el desarrollo de algunas tipos de cáncer o bien, el estudio de la formación de micronúcleos (MN), que es una prueba sencilla, económica y altamente informativa ^{7,9}.

El método clásico para detectar daño citogenético es el examen de metafases de células tratadas *in vivo* o *in vitro* con el agente a probar, pero 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 con validez estadística ^{7,9}; particularmente, en el caso de los Urodelos esta técnica se dificulta ya que éstos presentan de 24 a 66 pares de cromosomas como número diploide y en muchos casos su complemento está constituido por macro y micro cromosomas ¹⁰.

Prueba de Micronúcleos.-

La prueba de MN sirve para detectar el efecto de agentes genotóxicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados que al quedar fuera del núcleo forman estas estructuras ^{7,9}. La prueba permite detectar tanto agentes

clastogénicos (que rompen cromosomas) como aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico)^{8,11}, pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN¹² y presencia de centrómero¹³ o cinetocoro¹⁴. La formación de los MN se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un 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 que pueden ser fragmentos o cromosomas completos quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y son transformados en uno o varios núcleos secundarios, que como regla son más pequeños que el núcleo principal y de ahí el nombre de MN⁸ (Figura 1).

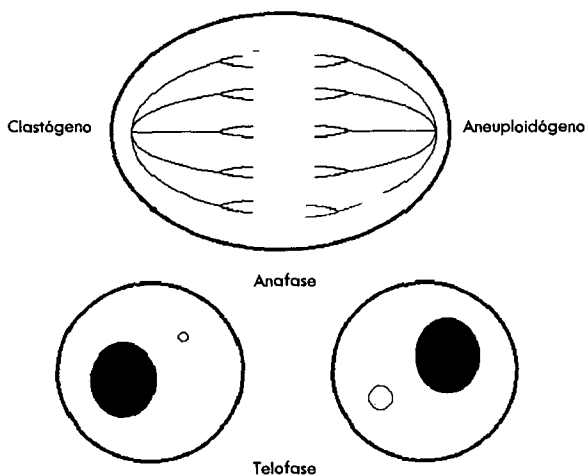


Figura 1.- Formación de Micronúcleos.

Ventajas y Limitaciones de la Prueba de Micronúcleos.-

★ Ventajas ^{7,9,15}:

1. Facilidad y rapidez para realizar la prueba.
2. La abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular.
3. La posibilidad de probar un solo químico sin otros compuestos.
4. Los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase.

★ Limitaciones ^{8,9}:

1. Sólo detecta agentes que producen fracturas o rezagos anafásicos.
2. Sólo es útil en poblaciones celulares que se dividen.

La técnica de MN ha sido realizada en diferentes especies ¹⁶ y en gran variedad de tejidos (Figura 2); es posible encontrar estas estructuras en eritrocitos policromáticos de médula ósea ⁹, cultivos de linfocitos de sangre periférica ^{7,17}, así como en eritrocitos de sangre periférica ¹⁸. En queratinocitos se ha demostrado utilidad para investigar tanto genotoxicidad como carcinogénesis ya que la inducción de MN puede ser un signo inicial de cáncer de piel ¹⁹; en células de la mucosa bucal, la presencia de células micronucleadas (CMN) se ha asociado a alteraciones citológicas en individuos fumadores ^{20,22}, también se han observado en hepatocitos de rata ²³⁻²⁵ y en células germinales ^{26,27}, en las que de existir daño genético, éste podría ser transmitido a la descendencia, y en general, la técnica se puede realizar en tejidos que presentan división continua ⁷.

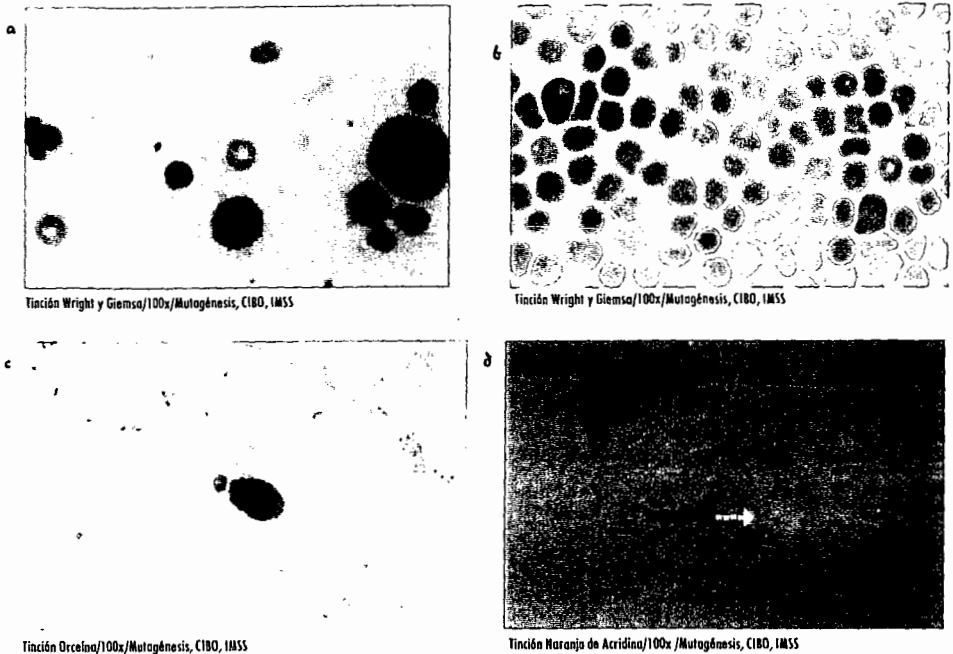


Figura 2.- Células Micronucleadas de Diferentes Tejidos. a) Médula ósea de ratón; b) Sangre periférica de ratón; c) Mucosa bucal de humano; d) Vagina de rata en proestro.

Agentes Micronucleogénicos.-

Los agentes micronucleogénicos son de dos tipos, con base en su mecanismo de acción:

- ❖ **Clastogénicos:** pueden ser análogos de base y actúan intercalándose en el ADN, inhibiendo su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlaces, que termina por producir una fractura cromosómica ²⁸, como por ejemplo la ciclofosfamida.
- ❖ **Aneuploidogénicos:** bloquean la formación del huso mitótico, originando de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos ^{12,29,30,32}, como por ejemplo, la colchicina.

En el presente trabajo se utilizó la colchicina como control positivo. La colchicina es un alcaloide (Figura 3a) de conocida micronucleogenicidad, aislado del azafrán (*Colchicum autumnale*) (Figura 3b).

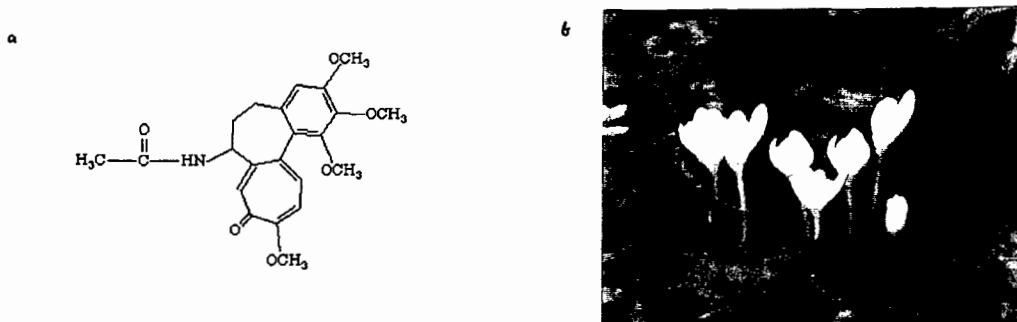


Figura 3.- Colchicina. a) Estructura química; b) *Colchicum autumnale*.

Este fármaco actúa bloqueando las fibras del huso mitótico, inhibiendo la división celular al unirse a la tubulina ya que interfiere con el ensamblaje o desensamblaje de estas fibras. La tubulina, como su nombre lo indica, forma fibras microtubulares que ayudan a dirigir la división celular. Estas fibras jalan a los cromosomas duplicados a cada lado de la célula parental, asegurando que cada célula hija reciba un juego completo de cromosomas (Figura 4) ^{12,30,32}.

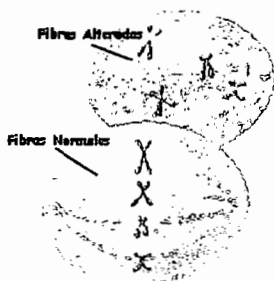


Figura 4.- Mecanismo de Acción de la Colchicina. *Inhibidor del huso mitótico.*

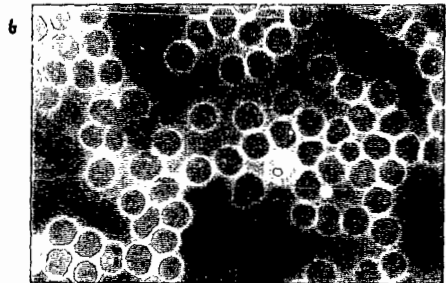
Los Urodelos.-

El empleo de organismos para el estudio de agentes genotóxicos se incrementa día a día ^{6,33,37} y, de manera particular, la utilización de sangre periférica de larvas de anfibios, como *Rana catesbeiana* ³⁸, *Xenopus leavis* ³⁹, *Rana temporaria* ³⁹ y *Pleurodeles waltl*, cuyos eritrocitos son grandes, siendo aproximadamente de 30 micras a diferencia del eritrocito humano de 8 micras (Figura 5), lo que facilita la observación de MN, si bien presentan inconvenientes, como el que sólo se utilicen larvas de cierta edad y necesariamente sean sacrificadas al momento de tomar la muestra de sangre ⁴⁰.

Los anfibios (anfi: *ambos* y bios: *vida*, de doble vida, acuática y terrestre) son una de las cinco clases de vertebrados y son notorios por ser evolutivamente los primeros tetrápodos (cuatro patas) que colonizaron la Tierra a partir de los peces.



Tinción Wright y Giemsa/100x/Mutagénesis, CIBO, IMSS



Tinción Naranja de Acridina/100x/Mutagénesis, CIBO, IMSS

Figura 5.- Eritrocitos de Sangre Periférica. a) Anfibio; b) Mamífero.

Esta clase de animales muestran gran diversidad de formas. Si se toma también en cuenta el aspecto de las especies extintas, puede verse cómo el modelo básico del cuerpo de los

vertebrados se ha desarrollado a partir de los anfibios con cola (Urodelos) (Figura 6). Los anfibios sin cola (Anura) y los anfibios sin patas (Apoda) son formas derivadas ⁴¹

La clase Anfibia se divide en tres órdenes:

ORDEN	CARACTERÍSTICAS
URODELA (<i>Salamandras y Tritones</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Caudados. • Cuatro miembros iguales.
ANURA (<i>Sapos y Ranas</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de cola. • Cuatro miembros, los posteriores están adaptados para saltar.
APODA (<i>Cecilias</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpo vermiforme. • Ausencia de patas.

Los Urodelos son uno de los tres órdenes que sobreviven actualmente de la clase de los anfibios (Figura 6), a este grupo pertenecen salamandras y tritones, estos últimos son miembros acuáticos de la familia *Salamandridae*.

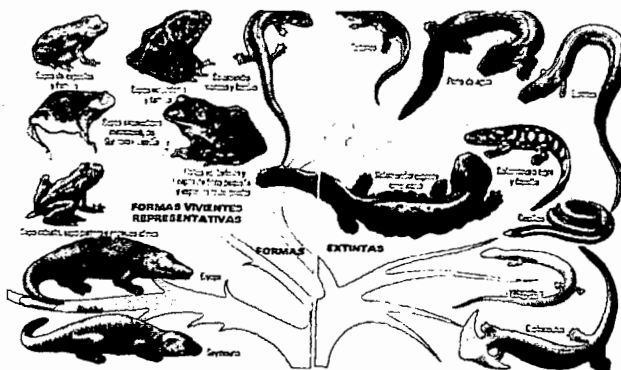


Figura 6.- Formas Extintas y Vivientes de los Anfibios.

Los Urodelos, en general, se pueden adaptar fácilmente al cautiverio y es común tenerlos como mascotas en acuarios caseros; existe información de la longevidad excepcional que pueden presentar en cautiverio, por ejemplo: *Ambystoma mexicanum* hasta 25 años, *Salamandra salamandra* 50 años, *Cryptobranchus alleganiensis* y *Andrias japonicus* 55 años de edad ¹⁰, si bien, esto no es lo común.

La piel de los anfibios, como la de todos los vertebrados se compone de dos estratos: epidermis y dermis (Figura 7).

- ✧ **Epidermis:** constituida de por los menos dos capas celulares, la externa contiene células muertas destinadas a impedir la desecación; esta piel se elimina y se sustituye con regularidad (muda).
- ✧ **Dermis:** mucho más espesa que la anterior, consta de dos capas, el estrato compacto interno y el externo. Este último es muy rico en glándulas mucosas, venenosas y cromatóforos, así como numerosos vasos sanguíneos ^{42,43}.

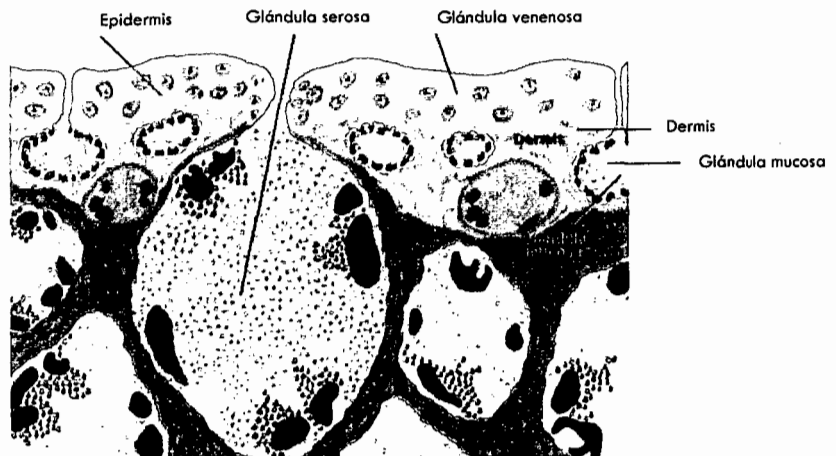


Figura 7.- Diagrama de la Piel de Anfibio.

La piel de los Urodelos presenta gran diversidad de funciones, como protección, sensibilidad y diversas interacciones con el medio ambiente; es lisa y permeable al agua. La induración de la piel (queratinización) no se manifiesta en los anfibios como sucede en otras especies, como peces, reptiles y aves ⁴², además, carecen de estructuras epidérmicas, por ejemplo escamas, plumas y pelo (Figura 8), características de otras clases de tetrápodos. La muda o cambio de piel es muy frecuente (característica ideal para la realización de la prueba de MN) y puede ser observada en una sola pieza (Figura 8) y si bien, ésta a menudo es devorada por el mismo organismo ^{10,41}, en cautiverio esta conducta puede modificarse y la recuperación de la piel se lleva a cabo sin problema.

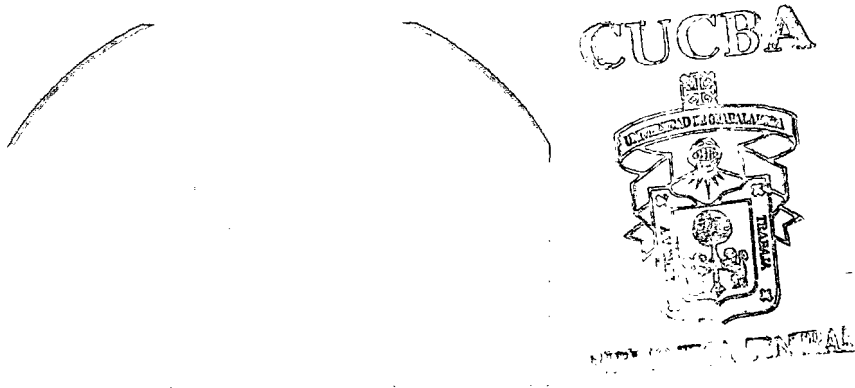


Figura 8.- Muda de Urodelo en una sola pieza.

En nuestro laboratorio se han realizado observaciones en un período de seis años con diferentes especies de Urodelos ^{44,45}, en los cuales se confirmó la frecuencia de la muda, que varió en tiempo desde 2.5 a 4 días dependiendo de la estación del año, así como también se observó que la frecuencia en el cambio del agua no afecta la muda.

En el estado larvario los anfibios respiran por branquias, el adulto puede respirar por pulmones (Figura 9) o a través de la piel, ya que ésta y la membrana mucosa de la cavidad oral, con su rica red de capilares sanguíneos, permiten que el oxígeno sea absorbido directamente tanto del aire como del agua ^{41,46,47}. Durante el desarrollo larvario de las salamandras, brotan primero las patas anteriores; las larvas pueden medir desde pocos centímetros hasta más de un metro ^{37,43,48} y estos animales presentan gran poder de regeneración de sus miembros ⁴³.

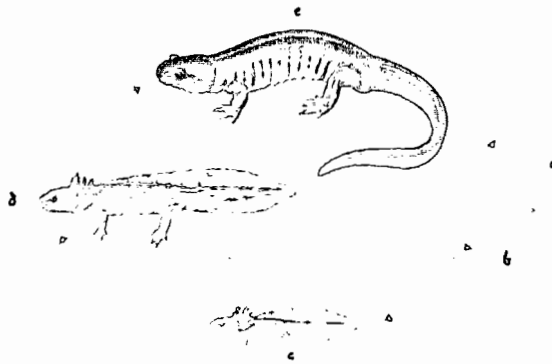


Figura 9.- Ciclo de Vida de los Urodelos. a) Huevo; b) Larva; c) Larva con branquias y membranas posteriores; d) Larva con branquias y membranas completamente desarrolladas; e) Adulto.

La metamorfosis de los Urodelos no es frecuente en su medio natural y existen algunas especies de Urodelos, como *Ambystoma mexicanum*, en la que ciertos individuos son resistentes a la metamorfosis, ésta es regulada por mecanismos neuroendocrinos, en donde hormonas producidas por la glándula tiroidea son las encargadas de controlar este proceso ^{49,50}. Algunos individuos de esta especie no producen tirotrina (TSH) en cantidad suficiente y como consecuencia su metamorfosis no se lleva a cabo ⁵¹, con lo que permanecen toda su vida como larvas (Figura 10a) alcanzando la madurez sexual para reproducirse en este estado, fenómeno conocido como neotenia.

La inducción de la metamorfosis en los individuos de este género bajo condiciones de laboratorio puede realizarse de manera eficaz mediante el incremento de la temperatura por arriba de los 20°C hasta los 25°C, ya que se ha observado que los cambios metamórficos no se presentan en los anuros ni en los urodelos a temperaturas por debajo de los 5°C. El efecto de la temperatura sobre la metamorfosis es en gran parte independiente de la función tiroidea. En aquellos individuos en los que esto no funciona por presentar una hipófisis defectuosa, se puede optar por agregar yodo al agua, finalmente, los animales que aún así no presentan metamorfosis, se puede proceder a la administración de hormonas tiroideas por vía oral, mezclado con su alimento y así los animales completen su metamorfosis ^{16,45,49,50}.

La razón por la que nos interesan los animales en estado adulto (Figura 10b) es porque, en el tiempo en que hemos estudiado a estos animales, se ha observado que la muda de las larvas se fragmenta en pedazos muy pequeños, los cuales no pueden ser analizados, mientras que los adultos mudan su piel en fragmentos grandes, incluso en una sola pieza ^{44,45} (Figura 8).



Figura 10.- *Ambystoma*. a) Larva; b) Adulto.

En el presente trabajo se plantea la posibilidad de utilizar la muda del *Ambystoma sp.*, como una forma nueva y original para la detección de agentes genotóxicos, básicamente micronucleogénicos, sin la necesidad del sacrificio de los animales, debido a la frecuencia con la que estos organismos cambian de piel de manera natural y el que esta piel no queratiniza.

Planteamiento del Problema.-

Existen una gran cantidad de pruebas para determinar la toxicidad de los compuestos. Sin embargo en toxicología genética se requiere de más de una prueba para determinar el potencial genotóxico de un compuesto, por lo que contar con diversas pruebas es importante. La prueba de MN tiene la ventaja de ser rápida, sencilla y económica, además la interpretación de los resultados no deja lugar a duda del daño producido.

El *Ambystoma sp.*, presenta una amplia distribución geográfica, se manipula y se adapta con facilidad a las condiciones de laboratorio. Debido a que su piel no queratiniza, lo que la hace más permeable al paso de las sustancias, a que el tiempo de recambio de la muda es corto (cada 2.5 días aproximadamente) y a que no es necesario su sacrificio para obtener las mudas, se plantea la siguiente pregunta:

¿ El *Ambystoma sp.*, puede ser un nuevo modelo para la prueba de MN mediante la observación de CMN de su muda al ser expuesto a colchicina ?

Hipótesis.-

El *Ambystoma sp.*, es un nuevo modelo para la prueba de MN mediante el incremento en el número de CMN de su muda al ser expuesto a colchicina.

Objetivos.-

General.-

Evaluar al *Ambystoma sp.*, expuesto a colchicina como un nuevo modelo para la prueba de MN mediante el conteo de CMN de su muda.

Específicos.-

- ✧ Determinar los valores basales de MN de la muda del *Ambystoma sp.*
- ✧ Inducir el incremento de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, administrando colchicina.

Material y Métodos.-

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

❖ **Selección de Organismos.-**

Se utilizaron 20 *Ambystoma mexicanum* donados por la Estación Biológica para el Estudio Integral del Axolotl de Xochimilco, D.F.

❖ **Manejo de Animales.-**

A su llegada al laboratorio los animales fueron puestos en cuarentena, se colocaron en peceras de 15x30x20 cm con 1,500 ml de agua, la que se cambió diariamente y se les asignó un número y un lugar constantes. Se alimentaron diariamente con "Blood worms" (alimento comercial).

❖ **Inducción de Células Micronucleadas.-**

La dosis de colchicina (conocido micronucleogénico) se determinó de acuerdo a la información descrita previamente en un trabajo realizado en el Laboratorio de Mutagénesis ⁵².

Se indujo la metamorfosis de aquellos individuos que lo requirieron (15 individuos, hormona tiroidea), de la manera descrita en los antecedentes y se formaron 2 grupos (Cuadro I), con 10 individuos cada uno: el grupo 1 o control y el grupo 2 o experimental, el cual recibió el inductor en el agua de la siguiente manera:

- ▲ Grupo 1 (control): mantenido sólo en agua, con el objetivo de manejar la variable de estrés en el experimento.
- ▲ Grupo 2: fue expuesto a 0.774 mg de colchicina/lit en 1,500 ml de agua diariamente por 5 días con el objetivo de observar incremento de CMN en el tiempo.

Cuadro 1.-

Dosis y Tiempo de Exposición a Colchicina en los Diferentes Grupos.

Grupo		Dosis de Colchicina		Tiempo de Exposición
1	→	Agua		
2	→	0.774 mg/lit	→	5 días

La exposición a colchicina para la inducción de CMN se inició el día en que el animal mudó, con la intención de utilizar esa muda como el control basal individual (el promedio de los valores basales de los animales utilizados se determinó como el valor normal de CMN en la especie) y posteriormente se colectaron las siguientes 5 mudas para comparar el número de CMN presentes en cada una contra su valor basal. El fragmento a analizar fue siempre de la región ventral del individuo.

Se colectaron 120 mudas en total (6 por individuo), las cuales se registraron con la fecha y el número del animal. Fragmentos de muda de la parte ventral del animal fueron colocados sobre portaobjetos, una vez secas las laminillas, se fijaron en metanol absoluto durante 48 horas para posteriormente teñirlas con la Tinción rápida Grifols (Anexo A). La observación de las muestras se realizó mediante microscopio de luz con el objetivo 100x, para contar las CMN en 2,000 células.

Las características tomadas en cuenta para considerar a una célula como normal fueron que presentara citoplasma con perímetro intacto y homogéneo, con bordes definidos, núcleo íntegro con perímetro distinguible (Figura 11a); mientras que en el caso de las CMN se tomó en cuenta

que tuvieran las características de la célula normal, además de que el MN tuviera forma redonda o almendrada, con tamaño menor a un tercio del núcleo, que presentara perímetro redondo, plano focal similar al del núcleo y con ausencia de empalme o puente con el núcleo (Figura 11b).



Tinción rápida Grifols/100x/Mutagénesis, CIBO, IMSS



Tinción rápida Grifols/100x/Mutagénesis, CIBO, IMSS

Figura 11.- Células de la Muda del *Ambystoma sp.* a) Célula normal; b) Célula micronucleada.

❖ **Definición de Variables**

- Independiente: *Administración del inductor micronucleogénico (colchicina).*
- Dependiente: *Número de CMN.*

❖ **Criterios de Inclusión.-**

1. Animales que muden cada 2.5 - 4 días.
2. Animales adultos con peso y tamaño similares en el grupo.
3. Fragmento de muda de la parte ventral del animal.

❖ **Criterios de Exclusión.-**

1. Animales que enfermen durante el tratamiento.
2. Mudadas destruidas, contaminadas y/o mal teñidas

✧ **Análisis Estadístico.-**

Los resultados fueron comparados por medio de la prueba T - de Student.

✧ **Ética.-**

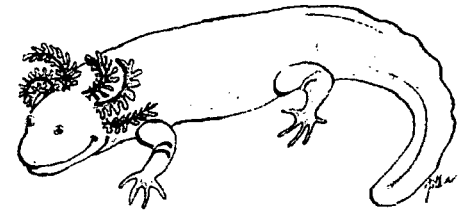
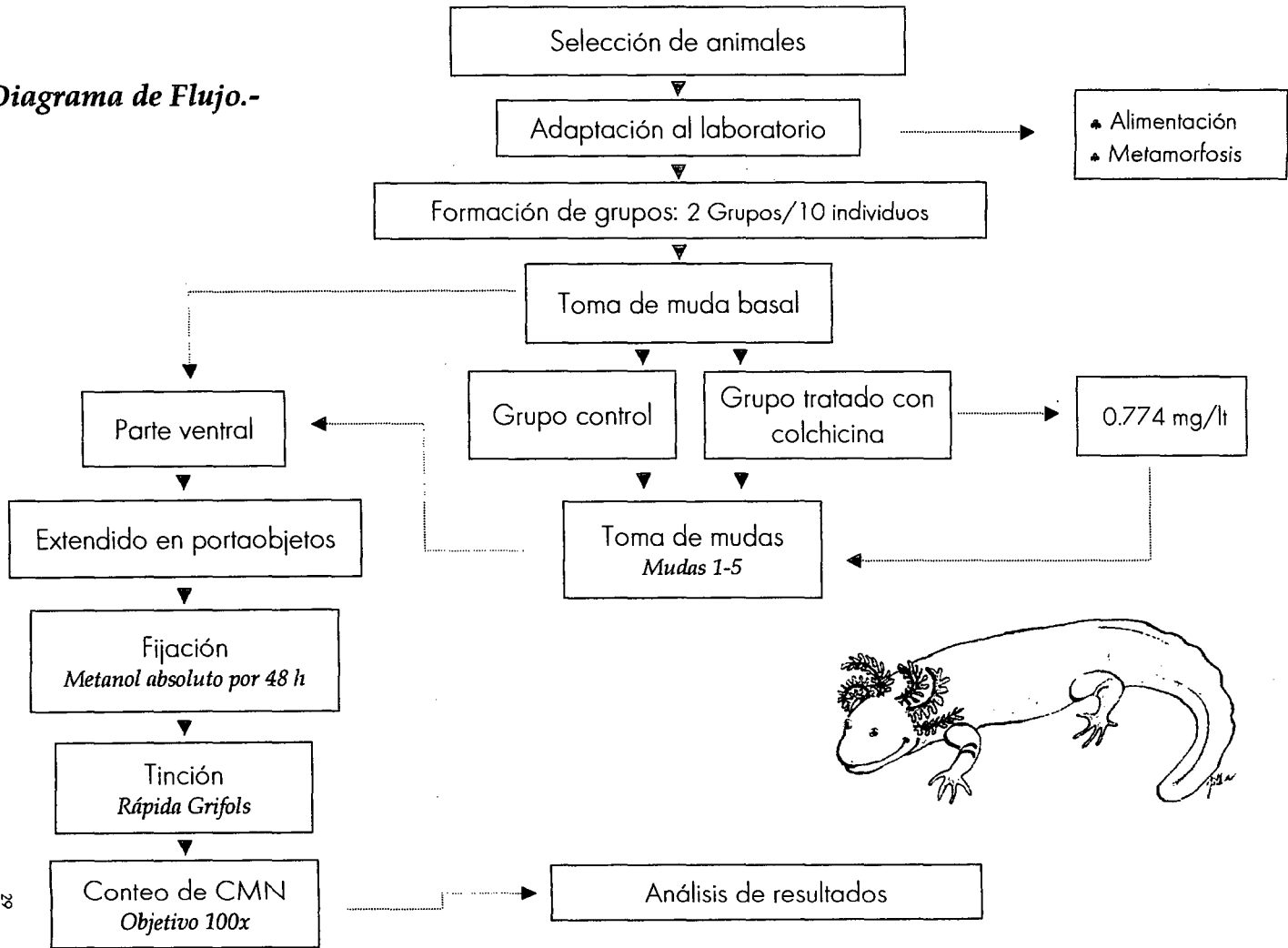
Los animales fueron tratados de acuerdo con los Requerimientos y Normas Institucionales y gubernamentales de México e Instituciones de Salud de los Estados Unidos de Norte América

53,54

✧ **Diseño.-**

- Tipo de estudio: *experimental*
- Por el tipo de captación de la información: *prospectivo*
- Por la medición del fenómeno en el tiempo: *longitudinal*
- Por la presencia de un grupo control: *comparativo*

Diagrama de Flujo.-



Resultados.-

Se analizaron en total 120 mudas, correspondientes a 6 mudas de cada uno de los 10 animales de los 2 grupos.

El promedio, desviación estándar, valores mínimo, medio y máximo de CMN, así como la significancia estadística de los valores de los diferentes grupos se muestran en el Cuadro II. Las comparaciones se hicieron entre la muda basal con las siguientes 5 mudas.

El promedio del valor basal de CMN en el *Ambystoma sp.*, obtenido en el presente trabajo a partir de 20 animales, fue 0.45 ± 0.88 CMN/2,000 células.

En el grupo 1 o control (el cual no se expuso a ninguna dosis de colchicina), el número de CMN no varió significativamente en el tiempo con respecto al valor basal del *Ambystoma sp.*, (Gráfica 1).

En el grupo 2 (dosis de colchicina: 0.774 mg/l diariamente durante 5 días), se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de la muda basal contra los valores de las mudas 1 ($p < 0.003$), 2 ($p < 0.003$), 3 ($p < 0.004$), 4 ($p < 0.0001$) y 5 ($p < 0.0004$) (Cuadro 2). El mayor número de CMN se pudo observar en la muda 4 y 2, con promedio de 8.8 CMN y 7.1 CMN/2,000 células, respectivamente (Gráfica 2).

Cuadro II.-

Promedios y Desviación Estándar de Células Micronucleadas de la Muda del *Ambystoma sp.*, en los Diferentes Grupos.

Grupos	n	Muda					
		Basal	1	2	3	4	5
1 (sólo agua)	10	0.1 ± 0.3 (0/0/1)	0.3 ± 0.4 (0/0/1)	0.3 ± 0.6 (0/0/2)	0.1 ± 0.3 (0/0/1)	0.3 ± 0.9 (0/0/3)	0 ± 0 (0/0/0)
			NS	NS	NS	NS	NS
2 (0.774 mg de colchicina /lt /5 días)	10	0.8 ± 1.1 (0/0/3)	3.5 ± 2.3 (1/3/8)	7.1 ± 5.7 (1/6.5/17)	5.2 ± 4.1 (1/5/16)	8.8 ± 5.2 (3/7.5/21)	6.6 ± 4.0 (0/8/15)
			p<0.003	p<0.003	p<0.004	p<0.0001	p<0.0004

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar.

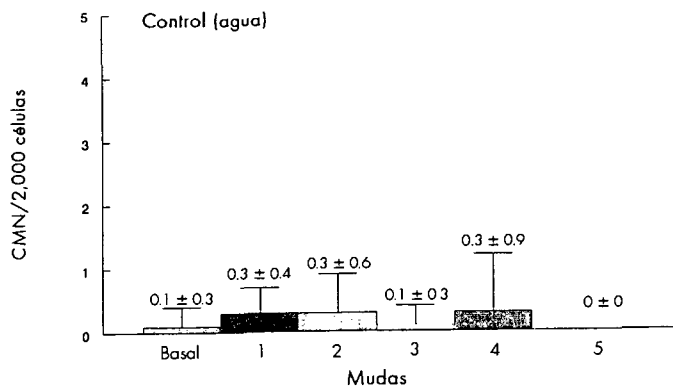
Los valores entre paréntesis se refieren al número Mínimo/Medio/Máximo de CMN.

n: Tamaño de la muestra

NS: No significativo.

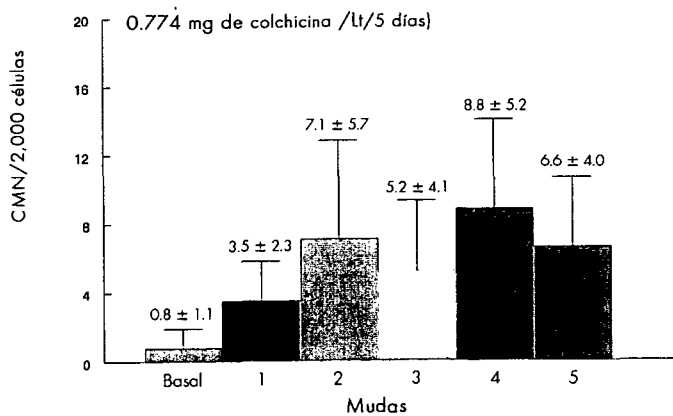
Gráfica 1.-

Promedio y Desviación Estándar de CMN del Grupo 1.



Gráfica 2.-

Promedio y Desviación Estándar de CMN del Grupo 2.



Discusión.-

Los resultados obtenidos demuestran, por las observaciones hechas en el grupo control, que la variable de manipulación, la inducción de metamorfosis, así como la alimentación no inducen la formación de CMN, ya que este grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas (Cuadro II). El promedio de CMN de este grupo fue de 0.1 ± 0.3 CMN/2,000 células con rango de 0 hasta 1 CMN, valor similar al valor basal total de 0.45 ± 0.88 CMN/2,000 con rango de 0 hasta 3 CMN, obtenido en el presente trabajo a partir de 20 *Ambystomas*.

En el *Ambystoma sp.*, fue posible inducir la formación de CMN de su muda al ser expuesto a colchicina, dosificada diariamente por 5 días, desde la muda 2 y manteniéndose la formación de CMN hasta la muda 5 (Gráfica 2), por lo que la efectividad del modelo sería a exposiciones prolongadas. Sin embargo, el modelo mostró ser muy sensible al genotóxico aquí empleado, ya que desde la muda 1 se observó incremento de CMN, siendo éste más evidente en las siguientes 4 mudas.

La alta sensibilidad de nuestro modelo es notoria comparada con lo descrito en la literatura, en donde se han obtenido resultados similares a los nuestros, pero con la diferencia de que en esos trabajos se utilizan eritrocitos de sangre periférica de larvas del Urodelo *Pleurodeles waltii*, además de que el número de animales (120 larvas aproximadamente), tiempo de exposición (alrededor de 7 días a 6 meses) y dosis utilizadas son mayores. Además de los inconvenientes del sacrificio de los animales al tomar la muestra de sangre ^{40,55-58}, mayor tiempo para la obtención de resultados y por supuesto, un aumento en el costo por el tiempo que se requiere para mantener a los especímenes.

El incremento de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, se observó desde la muda 2 hasta la muda 5 y con disminución de CMN en la muda 3 (Gráfica 2); este fenómeno podría ser un mecanismo de compensación debido al efecto del micronucleogénico de la colchicina, el cual se vuelve ligeramente citotóxico para el animal, lo que provocó disminución en la división celular de la muda y como consecuencia la disminución de CMN de dicha muda. El efecto de recambio en la muda también se modificó como consecuencia de la citotoxicidad de la colchicina, ya que el tiempo de recambio de las siguientes mudas se prolongó hasta 4 días, sin embargo la citotoxicidad de la colchicina no fue suficiente, lo que permitió la recuperación de los animales, puesto que en las siguientes mudas (4 y 5) (Gráfica 2) se observó incremento de CMN. El conocer en cual muda se observa el pico máximo de CMN es útil para sugerir, en futuros estudios en los que se quiera utilizar este modelo, cuáles mudas son las informativas con lo que se disminuirían tiempo y costo en la realización del experimento.

La colchicina presentó capacidad para producir rezagos anafásicos en la muda del *Ambystoma sp.*, por lo que se consideró como un potente micronucleogénico en este tejido, ya que en las células de la muda muchas veces se presentaron más de un MN por célula y en ocasiones se observaron hasta 3 CMN en un mismo campo (Figura 12).

La colchicina es un agente aneuploidógeno que actúa bloqueando la formación del huso mitótico, inhibiendo la división celular al unirse a la proteína tubulina. La tubulina, forma fibras microtubulares que ayudan a dirigir la división celular. Estas fibras jalan a los cromosomas duplicados a cada lado de la célula parental, asegurando que cada célula hija reciba un juego completo de cromosomas. La colchicina, por tanto, origina el rezago de cromosomas completos que no serán incluidos en los núcleos de las células hijas^{12,30}, con lo que los MN que se

producen son en general grandes, debido a que son cromosomas completos los que los constituyen^{7,12,15}.

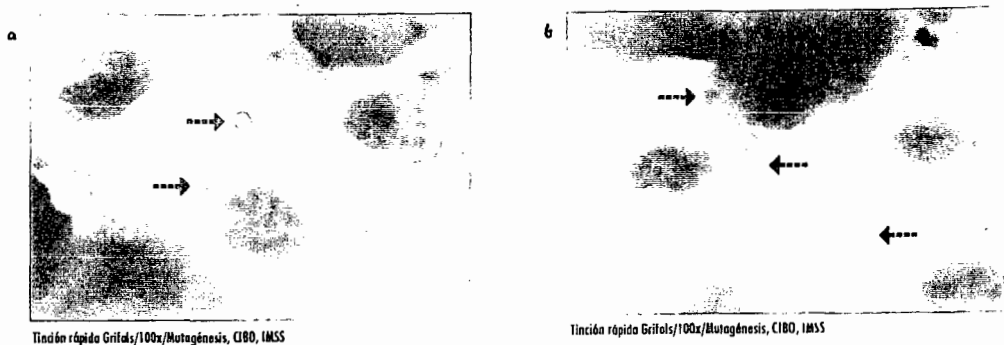


Figura 12.- CMN de la Muda del *Ambystoma sp.* Inducidas por Colchicina. a) Célula con dos MN; b) Tres CMN.

En el presente trabajo utilizamos un nuevo tejido (muda de *Ambystoma*) para la realización de la prueba de MN, tejido en donde no se ha descrito la presencia de CMN, por lo que el elegir a la colchicina como control positivo fue debido a que con esto esperábamos que los MN que se produjeran fueran grandes, con lo cual aseguramos que la observación de MN va a ser sencilla y la posibilidad de confundirnos con un artefacto es reducida (Figura 13).

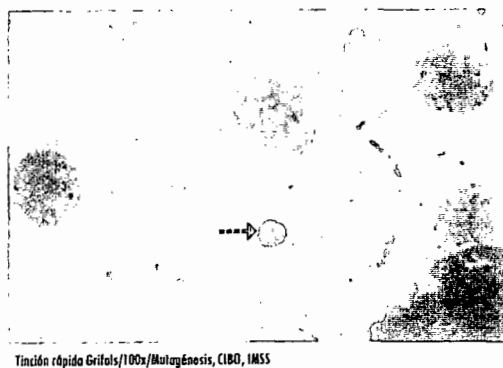


Figura 13.- Micronúcleo Inducido por Colchicina.

La obtención del fragmento de la muda no fue al azar, ésta fue tomada de la parte ventral ya que es la porción del cuerpo del animal que siempre está expuesta al agua. Partiendo del supuesto de que la piel del *Ambystoma sp.*, está conformada por diferente número de capas en las diferentes partes de la anatomía del animal, el obtener muestras sólo de esta parte garantiza la constancia en el número de capas entre la muda basal y las siguientes mudas. Al determinar la parte anatómica del animal para la obtención y observación del fragmento de la muda, evitamos tanto el desfase en la salida del efecto de la capa afectada por el genotóxico o la no observación del incremento de CMN.

Los Urodelos presentan recambio de la piel de manera periódica, pero también se ha descrito que ésta es devorada ^{10,41}. En el presente trabajo se observó que en el *Ambystoma sp.*, el recambio de la muda se presentó aproximadamente cada 2.5 a 4 días. El cautiverio y la alimentación modificada por las condiciones de laboratorio permiten alterar la conducta del devorado de la muda y poderla recuperar en su totalidad (Figura 8). La adaptación a las condiciones de laboratorio no fue problemática, pues los *Ambystoma* se adaptan fácilmente. Uno de los parámetros más importantes dentro de la adaptabilidad de los animales a condiciones diferentes a su medio es la alimentación y ésta fue realizada con un alimento comercial (Blood worms) que fue adecuado para los especímenes. Se han ensayado otras opciones de alimentación que igualmente funcionan como el hígado de rata, artemia viva y lombriz de tierra, sin embargo, estas opciones resultan ser poco prácticas por el gran número de animales que se manejan y en el caso de la lombriz de tierra y las artemias vivas se requiere cultivarlas para poder tener acceso al alimento todo el tiempo.

La demostración de la utilidad del *Ambystoma sp.*, como bioindicador mediante la prueba de MN en su muda, permite tener un nuevo modelo para estudios de genotoxicidad de compuestos que pueden ser disueltos en el agua. La vía de administración de compuestos en otros modelos *in vivo* consisten en preparar el compuesto a probar y administrarlo vía intraperitoneal, oral o subcutánea, pero siempre directamente del tubo de ensaye al organismo a probar, la mayoría de las veces en condiciones estériles y manteniendo refrigerado el compuesto o preparándolo cada vez que se utilice. Sin embargo, el modelo aquí presentado proporciona una alternativa adicional, que consiste en que el compuesto a probar queda expuesto al medio ambiente, esto es, no va directamente de la jeringa estéril al organismo, sino que queda expuesto a la acción de bacterias, hongos, luz o calor del medio, los cuales sabemos que pueden influir en los compuestos. En condiciones normales, los contaminantes de ríos o lagos están expuestos a estas mismas condiciones, lo que hace que el modelo sea más real.

Particularmente en este caso, y a manera de estudiar aguas con sospecha de contaminación, podríamos tener a los *Ambystoma* en el agua que se desee estudiar en el mismo lugar de origen o probar esa agua en el laboratorio para ahí exponer a los animales. El modelo, como se demostró en el presente, puede ser trabajado en el laboratorio para probar compuestos específicos e incluso da la posibilidad de utilizarlo en condiciones estrictas, como es el caso de otros modelos.

Todos los anfibios, además de respirar por pulmones o branquias, realizan intercambio de gases a través de la piel debido a la gran permeabilidad que presenta. Esta característica garantiza que el compuesto a probar será absorbido, en el caso particular del *Ambystoma*, tanto por vía cutánea como oral.

Los *Ambystoma* pertenecen al orden de los Urodelos y en general, el fenómeno de la muda es similar en todas las especies de este orden, por lo que la demostración del modelo aquí presentado abre la posibilidad de trabajar con mudas de otras especies de anfibios, siendo éste el tejido en el que se observen las CMN. Este último punto puede resultar importante ya que sólo del género *Ambystoma* existen en nuestro país 13 especies, que son el *A. amblycephalum*, *A. andersoni*, *A. bobypellum*, *A. dumerilii*, *A. flavipiperatum*, *A. granulosum*, *A. lermaensis*, *A. mexicanum*, *A. ordinarium*, *A. rosaceum*, *A. taylori*, *A. tigrinum* y *A. velasci*, siendo los más comunes *A. dumerilii*, *A. mexicanum* y *A. tigrinum*. La variedad de Urodelos en otros países también es abundante y es común la presencia de salamandras y tritones, los que podrían probarse con la intención de trabajar con especies endémicas de cada región, lo que hace a la prueba más económica y accesible.

Debido a que en otras especies ^{39,40,55-57,59,60} las exposiciones al compuesto a probar son prolongadas (semanas o meses), el presente modelo es también más económico, ya que el tiempo de exposición fue de 5 días, por lo que el gasto del compuesto es menor y los resultados se obtienen rápidamente.

Finalmente, el incremento de CMN y la velocidad del recambio de la muda nos permite tener una nueva alternativa para proponer al *Ambystoma sp.*, como un buen bioindicador sin necesidad de tener que utilizar técnicas invasivas en ellos, además, los *Ambystoma* presentan 28 macrocromosomas como número diploide ¹⁰, este dato es relevante ya que si se propone a un organismo como éste para la observación de CMN, la posibilidad de detectar agentes genotóxicos aneuploidógenos y/o clastógenos se facilita por el tamaño de los cromosomas o por la posibilidad de visualizar los fragmentos generados, que pueden ser de gran tamaño.

Conclusiones.-

- ✧ El promedio basal de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, es de 0.45 ± 0.88 CMN/2,000 células.
- ✧ La colchicina indujo la formación de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, al ser expuesto a dosis de 0.774 mg/lit durante 5 días y esta dosis no mostró efecto citotóxico suficiente para impedir la formación de CMN, aunque se observó ligera disminución de CMN en la muda 3.
- ✧ El incremento de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, se observó desde la muda 2 hasta la muda 5 y el mayor número de CMN de la muda del *Ambystoma sp.*, se observó en las mudas 2 y 4.
- ✧ El fragmento de la muda utilizado para la observación de CMN debe ser tomado siempre de la misma parte anatómica del animal, para evitar el desfase en la observación del efecto del genotóxico a probar.
- ✧ El *Ambystoma sp.*, es una nueva opción como modelo de laboratorio para el monitoreo de agentes genotóxicos, básicamente micronucleogénicos, mediante el conteo de CMN de fragmentos de su muda, sin la necesidad del sacrificio del animal para obtener la muestra.

Bibliografia.-

1. Perera FP, Hemminki K, Gryzbouska E, Motykiewicz G, Michalska J, Sautella RM, Young TL, Dickey C, Brandt-Ranf P, De Vivo J, Blaner W, Tsail WY, Chorazy M. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature*, 1992; 360:256-258.
2. Schull WJ. Late radiation responses in man: current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res*, 1983; 3:231-239.
3. Martin RH, Hildebrand K, Yamamoto J, Rademaker A, Barnes M, Douglas G, Arthur K, Ringrose T, Brown IS. An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutat Res*, 1986; 174:219-225.
4. 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*, 1992; 19:112-124.
5. Miguel AG, Daisey JM, Sousa JA. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ Mol Mutagen*, 1990; 15:36-43.
6. Jena GB, Bhunya SP. Use of chick, *Gallus domesticus*, as an *in vivo* model for the study of chromosome aberration: A study with mitomycin C and probable location of a hot spot. *Mutat Res*, 1995; 334:167-174.
7. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutat Res*, 1983; 123:61-118.
8. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975; 31:9-15.
9. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys Ph, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen*, 1991; 18:277-291.
10. Duellman W and Trueb L. *Biology of Amphibians*. USA: John Hopkins University Press; 1994. p 1-459.

11. Heddle JA, Lue CB, Saunder F, Benz D. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res*, 1978; 38:2983-2988.
12. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res*, 1980; 71:127-131.
13. Odagiri Y, Zhang J, Uchida H, Kawamura K, Adachi S, Takemoto K. Predominant induction of kinetochore-containing micronuclei by extracts of diesel exhaust particulates in cultures human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 1994; 23:45-50.
14. Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronuclei assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*, 1995; 343:85-95.
15. Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutat Res*, 1983; 120:127-132.
16. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res*, 1996a; 369:123-127.
17. Krogh JM, Nyfors A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells *in vivo*. *Mutat Res*, 1979; 64:339-343.
18. Zúñiga-González G, Ramírez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res*, 1998; 413:187-189.
19. Shuilin H, Baker RSU. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 14:1-5.
20. Doolittle DJ, Lee CK, Ivetl JL, Mirsalis JC, Riccio E, Rudd CJ, Burger GT, Hayes AM. Comparative studies in the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn of only heat tobacco. *Environ Mol Mutagen*, 1990; 15:93-105.

21. 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*, 1990; 15:136-144.
22. Tolbert P, Shy C, Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*, 1992; 271:69-77.
23. 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*, 1990; 15:190-197.
24. Ashby J, Lefebvre PA. Mitogenesis, micronuclei and carcinogenesis in the rat liver: some basic inconsistencies. *Environ Mol Mutagen*, 1992; 20:29-38.
25. Sakahara H, Ono K, Saga T, Akuta K, Endo K, Kouishi J, Abe M. Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmunotherapy assessed by micronucleus assay. *Int J Radiat Biol*, 1992; 62:443-448.
26. Lähdeci J. Micronuclei induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res*, 1983; 120:257-260.
27. 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*, 1992; 19:125-131.
28. Beaula KD, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res*, 1991; 263:185-196.
29. Pearson HA, Johnston D, Smith KA, Touloukian RJ. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. *N Engl J Med*, 1978; 298:1389-1392.
30. Iwai M, Arimura H. Effect of multiple dosing of phenacetin on micronucleus induction: a supplement to the international and Japanese cooperative studies. *Mutat Res*, 1990; 245:11-14.
31. Williams WJ, Beautler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Hematology. 4th, USA: McGraw-Hill; 1990. p 308-698.
32. Hellman S, Vokes EE. Advancing current treatments for cancer. *Sci Ame*, 1996; 275:284.

33. Choy WN, Willhite CC, Cukierski MJ, Book SA. Primate micronucleus study of L-selenomethionine. *Environ Mol Mutagen*, 1989;14:123-125.
34. Ruiz EF, Valtierra RE, Lecona SU, Perez AB, Ma TH. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and *in situ* monitoring. *Mutat Res*, 1992; 270:45-51.
35. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*, 1995; 343:121-135.
36. Burgeot T, His E, Galgani F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res*, 1995; 342:125-140.
37. Ma TH, Xu Z, Xu Ch, McConnell H, Arreola GA, Zhang H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res*, 1995; 334:185-195.
38. Krauter PW, Anderson SL, Harrison FL. Radiation induced micronuclei in peripheral erythrocytes of *Rana catesbeiana*. an aquatic animal model for *in vivo* genotoxicity studies. *Environ Mol Mutagen*, 1987;10:285-296.
39. Rudek Z, Rozek M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutat Res*, 1992; 298:25-29.
40. Jaylet A, Deparis P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat Res*, 1986; 164:245-257.
41. Lanka V, Vit Z. *Anfibios y Reptiles*. 2º, Madrid: Susaeta; 1990. p 1-224.
42. Ballasina D. *Anfibios de Europa*. México, DF: Diamond; 1985. p 10-11.
43. Freiberg MA. *Los anfibios, la rana y su crianza*. Argentina: Albatros; 1989. p 1-115.
44. Zúñiga G. Selección de Animales para ser Utilizados como Indicadores de Agentes Genotóxicos mediante el Conteo de Micronúcleos. Tesis de Grado, Doctorado en Ciencias de la Salud Orientación Biomédicas. Universidad de Guadalajara. México. 1996b.

58. Fernandez M, L'Haridon J. Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt. *Environ Mol Mutagen*, 1994; 24:124-136.
59. Hootman RN, Raat WK. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. *Mutat Res*, 1982; 104:147-152.
60. Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Kinai N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Asano N, Sofuni T, Ojima Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res*, 1998; 20:125-33.

Glosario.-

- ✧ **Anafase.-** Tercera etapa de la mitosis durante la cual los cromosomas migran hacia los polos opuestos de la célula.
- ✧ **Anfibio.-** Clase de vertebrados que comprende los más primitivos tetrápodos terrestres: sapos, ranas, tritones, salamandras y cecilias.
- ✧ **Aneuploidógeno.-** Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.
- ✧ **Bioensayo.-** Determinación del poder activo de una droga por comprobación de su efecto sobre un organismo vivo o un preparado aislado de órgano.
- ✧ **Bioindicador.-** Organismo utilizado para detectar algún tipo de contaminante.
- ✧ **Carcinógeno.-** Cualquier agente que produce cáncer.
- ✧ **Centrómero.-** Pequeña masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma y a la que se unen las dos cromátidas. El centrómero ocupa una posición característica en todo cromosoma. Es la última parte del cromosoma que se divide y por medio del cual se fija al huso.
- ✧ **Clastógeno.-** Agente capaz de ocasionar rupturas en el ADN.
- ✧ **Cromosoma.-** Cuerpo constituido por ADN incluido dentro de una trampa proteica; son los portadores de la información genética. Se encuentran en el núcleo de la célula y pueden observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular.
- ✧ **Genotóxico.-** Agente que afecta al ADN.
- ✧ **Metamorfosis.-** Cambio de forma o estructura, en particular, transición desde una etapa del desarrollo hacia otra como desde el estado larvario hasta la forma del adulto.

- ✧ **Micronúcleo.-** Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo quedando en el citoplasma celular.
- ✧ **Micronucleogénico.-** Agente formador de micronúcleos.
- ✧ **Muda.-** Recambio periódico normal de la piel de algunos organismos, como en anfibios y en reptiles.
- ✧ **Mutación.-** Cambio permanente y heredable del material genético. Definido comúnmente como un cambio en un solo gen (mutación puntual), aún cuando el término se usa también para designar un cambio en el número o disposición de los cromosomas.
- ✧ **Neotenia.-** Persistencia de caracteres larvarios u otros juveniles más allá de la etapa normal en el desarrollo de un animal. Puede ser temporal por factores climáticos u otros, o permanente en cuyo caso el animal se reproduce en la etapa larval.
- ✧ **Telofase.-** Período de la división celular que inicia cuando los cromosomas llegan a los polos de la célula.
- ✧ **Tetrápodo.-** Vertebrado de cuatro extremidades como los anfibios, aves, mamíferos y reptiles.
- ✧ **Urodelo.-** Orden de anfibios caudados, con cuerpo alargado y piel lisa.

Anexo.-

Anexo A

Preparación y Análisis de las Muestras.

★ Fijación de Fragmentos de Muda.-

1. La muda es colocada en una caja petri con agua destilada (para evitar contaminación por bacterias y residuos de sales que podrían dificultar la observación al microscopio).
2. Se cortan fragmentos de muda de 2 x 1 cm aproximadamente, los que se colocan sobre portaobjetos.
3. Se extiende perfectamente la porción de muda, tratando de eliminar la mayor cantidad de agua de la laminilla.
4. La muestra se deja secar en una estufa a 37 °C por 20 minutos.
5. Una vez seca la laminilla se sumerge en metanol absoluto durante 48 h (con esto se evita que el fragmento de muda se desprenda de la laminilla en el proceso de la tinción)
6. Se deja secar a temperatura ambiente.
7. Se procede a teñir.

★ Tinción de Muestras.-

La tinción de las laminillas se realizó con la tinción rápida Grifols (Grifols 101.000A), colorante diferencial de células.

★ Reactivos.-

- Fijador: *Solución alcohólica* (Grifols 101.000A)
- Colorante 1: *Solución ácida (tiñe citoplasma)* (Grifols 101.000A)
- Colorante 2: *Solución básica (tiñe núcleo)* (Grifols 101.000A)

❖ **Método.-**

1. Sumergir el portaobjetos con la muestra en la solución fijadora durante 5 segundos (5 inmersiones de 1 segundo). Dejar escurrir el exceso de fijador.
2. Sumergir el portaobjetos en el colorante 1 (solución ácida) durante 5 segundos (5 inmersiones de 1 segundo). Dejar escurrir el exceso de colorante.
3. Sumergir el portaobjetos en el colorante 2 (solución básica) durante 5 segundos (5 inmersiones de 1 segundo).
4. Enjuagar el portaobjetos con agua destilada o desionizada.
5. Dejar secar al aire.
6. Examinar con el objetivo 100x para contar las CMN en un total de 2,000 células.

Si el análisis de las laminillas no se hará inmediatamente antes o después de la tinción, estas pueden ser almacenadas en cajas con tapa para evitar que se llenen de polvo. Se recomienda leer las laminillas en un plazo no mayor a 2 meses posterior a la tinción ya que las células de la muda podrían desprenderse del portaobjetos con el tiempo.

❖ **Interpretación.-**

- Núcleo (ADN): *azul o púrpura* (Figura 11a y 11b).
- Citoplasma: *lila o azul claro* (Figura 11a y 11b).