

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Posgrado en Ciencias Biológicas



**Eritrocitos con prolongaciones nucleares: Nueva alternativa
para detectar genotóxicos en el ambiente**

Por

Jaime Luna Aguirre

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

(Área Ecología)

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, enero, 2009

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Posgrado en Ciencias Biológicas



**Eritrocitos con prolongaciones nucleares: Nueva alternativa
para detectar genotóxicos en el ambiente**

Por

Jaime Luna Aguirre

Director de tesis

Dra. en C. Ana Lourdes Zamora Perez

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

(Área Ecología)

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, enero, 2009

**Eritrocitos con prolongaciones nucleares: Nueva
alternativa para detectar genotóxicos en el
ambiente**

Este trabajo se realizó en el:

Laboratorio de Mutagénesis

Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)

Asesores Externos:

Dr. en C. Guillermo M. Zúñiga González

Dra. en C. Belinda Claudia Gómez Meda

“El que con lobos anda a aullar se enseña”

Con mi más profundo agradecimiento a mis amigos colaboradores en esta tesis y maestros por todo lo aprendido y sobre todo su amistad y apoyo.

Dedicatoria

"Contigo la milpa es rancho y el atole champurrado"

Ana Rosa.

Mi compañera de siempre, muchas gracias por compartir tu vida conmigo, mi segundo gran acierto es mi profesión, el primero fuiste tú, para tí todo mi amor y mi vida entera.

"El que porfía mata venado"

Liliana y Jaime.

Mis grandes amores, cuando llegaron a mi vida supe realmente lo que es amar, que nadie les diga nunca que no se puede, en nuestra casa su abuelito Jaime prohibió la frase "no puedo", ustedes sigan sus sueños hasta alcanzarlos.

A ustedes tres dedico este trabajo, mi profesión y mi vida entera.

Agradecimientos

“No le pido a dios me dé, si no que me ponga donde hay”

A Dios, por todas las oportunidades que me da, por la vida, mi familia y mi trabajo.

“Hijo de maguey, mecate”

A mis padres Jaime y Cuca, por su amor apoyo y ejemplo,

“A los hombres y a las mujeres, por su origen se les conoce”

A mi universidad, con el compromiso de siempre llevar su nombre muy en alto,

“El que a buen árbol se arrima buena sombra le cobija”

Al laboratorio de Mutagénesis

CIBO, IMSS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias

Universidad de Guadalajara

A los sinodales:

- Dra. en C. Belinda Claudia Gómez Meda
- Dr. en C. Francisco Martín Huerta Martínez
- Dr. en C. Alejandro Muñoz Urias
- Dra. en C. María Luisa Ramos Ibarra

Por su valiosa colaboración y sugerencias para mejorar este trabajo.

Índice

	Página
Abreviaturas	xv
Resumen	xvi
Summary	xviii
Introducción	1
Antecedentes	3
o Prueba de micronúcleos	3
o Prolongaciones nucleares	7
o Eritrocitos	11
o Sistema reticuloendotelial	13
o Agentes genotóxicos	15
o Bioindicadores	18
o Perico atolero	20
o Cocodrilo de pantano	23
Planteamiento del problema	28
Hipótesis	30
Objetivos	31
o General	31
o Particulares	31
Material y métodos	33
o Sede	33
o Diseño	33
o Definición de variables	33
o Criterios de inclusión	33
o Criterios de exclusión	33
o Selección de los organismos	34

	Página
o Inducción de micronúcleos y prolongaciones nucleares con mitomicina-C en el perico atolero	36
o Inducción de micronúcleos y prolongaciones nucleares con ciclofosfamida en el cocodrilo de pantano	37
o Preparación y análisis de las muestras	38
o Análisis estadístico	40
o Consideraciones éticas	41
o Consideraciones legales	41
o Diagrama de flujo	42
Resultados	42
o Inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados con mitomicina-C en el perico atolero	43
o Inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados con ciclofosfamida en el cocodrilo de pantano	47
Discusión	57
o Inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados con mitomicina-C en el perico atolero	58
o Inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados con ciclofosfamida en el cocodrilo de pantano	59
Conclusiones	68
Perspectivas	69
Bibliografía	70
Glosario	79
Apéndice	81
o Preparación y análisis de muestras	81
Anexos	84
o A: Número de registro del proyecto	84
o B: Permiso de colecta para el cocodrilo de pantano (<i>C. moreletii</i>)	85

	Página
o C: Permiso de depósito y experimentación para el cocodrilo de pantano (<i>C. moreletii</i>)	89
o D: Acta de devolución de ejemplares de vida silvestre	91
o E: Productos generados a partir de esta tesis Doctoral	92
- Artículo: Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (<i>Aratinga canicularis</i>) related to genotoxic damage. Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Ramos-Ibarra ML, Torres-Bugarín O, Batista-González CM, Zúñiga-González GM. Avian Pathol. 2006;35:206-210.	93
- Obtención del segundo lugar en la exposición de carteles de investigación en la categoría Formal, Científica y Tecnológica, dentro de las jornadas académicas: “La Importancia de la Consolidación de Cuerpos Académicos de la Calidad de la UAG”, llevadas a cabo en la Universidad Autónoma de Guadalajara del 3 al 6 de julio del 2006.	100

Índice de Cuadros

	Página
1. Formación de grupos, dosis y tiempo de exposición para la inducción de eritrocitos micronucleados y eritrocitos con prolongaciones nucleares en el perico atolero	36
2. Formación de grupos, dosis y tiempo de exposición para la inducción de eritrocitos micronucleados y eritrocitos con prolongaciones nucleares en el cocodrilo de pantano	37
3. Efecto de la mitomicina-C en el número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el perico atolero	43
4. Efecto de la mitomicina-C en el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en las aves tratadas	45
5. Efecto de la ciclofosfamida en el número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el cocodrilo de pantano	51
6. Efecto de la ciclofosfamida en el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en los cocodrilo de pantano	10

Índice de Figuras

	Página
1. Eritrocitos micronucleados de sangre periférica de mamífero	4
2. Formación de micronúcleos	5
3. Células micronucleadas en diferentes tejidos	6
4. Células con prolongaciones nucleares	8
5. Esquema del posible origen común de los micronúcleos y las prolongaciones nucleares	8
6. Modelo que ejemplifica la formación de micronúcleos y prolongaciones nucleares a partir de remanentes de puentes anafásicos	10
7. Distintas formas de eritrocitos en diferentes especies	12
8. Eritrocitos nucleados	13
9. Estructura del bazo	14
10. Agentes genotóxicos	17
11. Perico atolero (<i>A. canicularis</i>)	21
12. Distribución geográfica del perico atolero	22
13. Características morfológicas del cocodrilo de pantano (<i>C. moreletii</i>)	23
14. Distribución geográfica del cocodrilo de pantano	24
15. Alojamiento de los pericos	15
16. Localización de la laguna de Alcu zahue, Colima, Colima, México	34
17. Alojamiento de los cocodrilos	35
18. Manejo del perico atolero	36
19. Manejo del cocodrilo de pantano	37
20. Muestras de eritrocitos nucleados de sangre periférica	39
21. Albergue para cocodrilos con temperatura controlada	47
22. Diagrama del prototipo diseñado para albergar cocodrilos con temperatura controlada	49
23. Eritrocitos de cocodrilo en mitosis	55
24. Sexado visual de crías de cocodrilo de pantano	60

	Página
25. Comparación del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados	63
26. Muestras de eritrocitos nucleados con prolongaciones nucleares de diferentes especies	64

Índice de Gráficas

	Página
1. Distribución del número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el perico atolero	44
2. Distribución del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares	46
3. Distribución del número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el cocodrilo de pantano	51
4. Distribución del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en el cocodrilo de pantano	54

Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **CF:** Ciclofosfamida.
- **D.E.:** Desviación estándar (estadística).
- **EMN:** Eritrocitos micronucleados.
- **ENC:** Eritrocitos normocromáticos.
- **EPC:** Eritrocitos policromáticos.
- **EPCMN:** Eritrocitos policromáticos micronucleados.
- **EPCPN:** Eritrocitos policromáticos con prolongación nuclear.
- **EPN:** eritrocito con prolongación natural.
- **ET:** Eritrocitos totales.
- **i.c.:** Intracelómica.
- **MMC:** Mitomicina-C.
- **MN:** Micronúcleo.
- **n:** Tamaño de muestra (estadística).
- **PN:** Prolongación nuclear.
- **v.o.:** vía oral.

Resumen

Las anomalías nucleares en eritrocitos, como los micronúcleos (MN) y las prolongaciones nucleares (PN), se consideran biomarcadores de exposición genotóxica. Previamente, se ha descrito la frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados (EMN) en el perico atolero (*Aratinga canicularis*) y en el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). En este estudio, utilizamos a estas dos especies para valorar la inducción de MN y PN con mitomicina-C (MMC) o ciclofosfamida (CF). Los grupos formados con pericos atoleros recibieron una inyección intracelómica de 2, 3 ó 4 mg de MMC/Kg cada 24 h durante dos días consecutivos y los grupos de cocodrilo de pantano recibieron vía oral 4, 7 ó 10 mg de CF/Kg cada 24 h durante dos días consecutivos. De ambas especies se obtuvo una gota de sangre, se realizaron frotis cada 24 h y se tiñeron con naranja de acridina para determinar el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares (EPN) y eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 eritrocitos totales (ET), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares (EPCPN)/1,000 eritrocitos policromáticos (EPC). También se determinó la proporción de los EPC/1,000 ET. En el experimento con pericos atoleros, el número de EPCMN y EPCPN incrementó a las 24, 48 y 72 h tras la administración de la dosis más baja ($P < 0.03$). A la dosis de 3 mg/Kg, la frecuencia de EPCMN aumentó a las 48 y 72 h ($P < 0.04$), mientras que el número de EPCPN aumentó, aunque no de manera significativa. La administración de 4 mg de MMC/Kg produjo incremento significativo en el número de EMN a las 72 h ($P < 0.03$), en los EPCMN a las 48 h ($P < 0.01$) y 72 h ($P < 0.006$), en la frecuencia de PN a las 72 h ($P < 0.05$) y de EPCPN a las 48 y 72 h ($P < 0.001$).

En los cocodrilos, el número de EPN incrementó significativamente a las 24 h ($P < 0.05$), 72 h ($P < 0.04$) y 120 h ($P < 0.03$) tras la administración de la dosis baja de CF. A la dosis de 7

mg de CF/Kg, el número de EMN incrementó a las 48 h ($P<0.04$) y 72 h ($P<0.03$), así como la frecuencia de EPN a las 120 h ($P<0.03$) y de EPCPN a las 48 h ($P<0.03$) y 72 h ($P<0.04$). La dosis alta de CF, incrementó el número de EPN a las 24 h ($P<0.01$), 48 h ($P<0.001$), 72 h ($P<0.01$) y 96 h ($P<0.03$) y de EPCPN a las 72 h ($P<0.05$) y 96 h ($P<0.01$).

Estos resultados sugieren que los EPN pueden ser una nueva alternativa complementaria para detectar genotóxicos en el ambiente cuando se trabaja con especies que presentan eritrocitos nucleados, como es el caso de los peces, anfibios, reptiles y aves o cuando sea difícil establecer la frecuencia de EMN espontáneos.

Summary

Nuclear abnormalities in erythrocytes, as micronuclei (MN) and nuclear protrusions (NP), are considered potential biomarkers of genotoxic exposure. We described previously the frequency of spontaneous micronucleated erythrocytes (MNE) in the species Orange-fronted parakeet (*Aratinga canicularis*) and Morelet's crocodile (*Cocodylus moreletii*).

Here, we have used these two species to assess the induction of MN and PN with mitomycin-C (MMC) and/or cyclophosphamide (CF). The groups formed with Orange-fronted parakeet were given a single intracoelomic injection of 2, 3 or 4 mg/Kg MMC each 24 h on two consecutive days. Crocodile groups received a single oral dose of 4, 7 or 10 mg/Kg CF daily h on two consecutive days. A drop of blood was obtained from 7 Orange-fronted parakeet and 5 Crocodile from each group and stained smears were used to count nuclear protrusions (NP) and micronucleated erythrocytes (MNE)/10,000 total erythrocytes (TE), polychromatic erythrocytes with nuclear protrusions (NPPCE) and micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE))/1,000 polychromatic erythrocytes (PCE). The proportion of number of PCE/1,000 TE was also counted.

In the case of parrots, MNPCE and NPPCE frequencies were elevated at 24, 48, and 72 h after the administration of the lower dose ($P < 0.03$). At a 3 mg/Kg dose, the frequency of MNPCE increased at 48 and 72 h ($P < 0.04$), whereas the number of NPPCE increased, but not significantly. Administration of 4 mg/Kg MMC increased the number of MNE observed at 72 h ($P < 0.03$), the number of MNPCE at 48 h ($P < 0.01$) and 72 h ($P < 0.006$), the NP frequency at 72 h ($P < 0.05$), and the frequency of NPPCE at 48 and 72 h ($P < 0.001$).

In crocodiles, NP increased significantly at 24 h ($P < 0.05$), 72 h ($P < 0.04$) and 120 h ($P < 0.03$) after the administration of the lower dose of CF. Oral dose of 7 mg/Kg CF, increased MNE number at 48 h ($P < 0.04$) and 72 h ($P < 0.03$) as well as the frequency of

NP at 120 h ($P<0.03$) and NPPCE at 48 h ($P<0.03$) and 72 h ($P<0.04$). The highest dose of CF, increased NP frequency at 24 h ($P<0.01$), 48 h ($P<0.001$), 72 h ($P<0.01$) and 96 h ($P<0.03$) and NPPCE at 72 h ($P<0.05$) and 96 h ($P<0.01$).

These results suggest that NP can be used to evaluate environmental genotoxic exposure of model species with nucleated erythrocytes such as fish, amphibians, reptiles and birds, or when it is difficult to establish the spontaneous MNE frequency.

Introducción

La contaminación de los ecosistemas y de los hábitats de vida silvestre por emisiones, descargas y residuos industriales y urbanos, compuestos químicos y tecnologías utilizadas en la fertilización de suelos y fumigación de cultivos, son algunas de las principales causas que ponen en peligro la sobrevivencia de muchas especies silvestres y por ende, atentan contra la riqueza genética del país, ya que los organismos vivos están expuestos constantemente a elementos que por sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas, al ser ingeridos, inhalados, aplicados tópicamente o inyectados, son capaces de provocar alteraciones orgánicas, funcionales y aún la muerte Córdoba 2001; Zúñiga-González 2003a, lo que modifica de manera aún no conocida el acervo genético de la fauna silvestre con compuestos o elementos genotóxicos presentes en los hábitats naturales Semarnat 1997.

Tal exposición puede ser inadvertida, accidental o incluso inevitable o intencional. Algunos de estos elementos son “inocuos”, pero una parte de ellos pueden provocar reacciones biológicas de naturaleza tóxica. A menudo estas reacciones dependen de la conversión de las sustancias absorbidas en un metabolito activo, que puede provocar con ello fenómenos de mutagenicidad, teratogenicidad o carcinogenicidad Pariza 1990; Katzung 1991; Montoya-Cabrera 1992; Gibson 1994.

Desde los años cuarenta se demostró que extractos de partículas llevadas por el viento pueden producir tumores en ratones y el desarrollo de tumores es un proceso de múltiples etapas que inicia con una mutación Miguel 1990.

Las teorías actuales tienden a considerar a la oncogénesis y la mutagénesis como expresiones diferentes de un mismo mecanismo básico. La mayor parte de los agentes oncogénicos pueden causar mutaciones y se ha demostrado que muchos mutágenos producen tumores en condiciones de prueba apropiadas Bloom 1987.

Día a día se liberan compuestos al medio ambiente de los que se desconoce su genotoxicidad, lo que obliga a la búsqueda de nuevos métodos o modelos para su estudio Pariza 1990; Shelby 1993, con lo que se genera la siguiente pregunta ¿Cómo evaluar la presencia de agentes genotóxicos en el medio ambiente tanto terrestre, aéreo y acuático?

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 Plewa 1982, ya que para realizar el monitoreo por análisis directo de contaminantes se requiere de precisión y conocer el agente químico a verificar, además su evaluación está limitada a la sensibilidad y especificidad del método utilizado, en cambio, el utilizar bioensayos ofrece las ventajas de que un organismo vivo puede metabolizar un compuesto a otros que pueden ser más tóxicos, además de que no se requiere conocer el compuesto a estudiar Plewa 1982.

Existen gran cantidad de pruebas para determinar la toxicidad de los compuestos, sin embargo, debido a que en toxicología genética se requiere de más de una prueba para determinar el potencial genotóxico de un compuesto, poder contar con diversas alternativas es vital Shelby 1993. Las pruebas para la detección de agentes genotóxicos son de gran importancia, ya que estos compuestos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos incluido al hombre Plewa 1982, además pueden tener efectos teratogénicos Luck 1977, causar mutaciones en células germinales Plewa 1982, inducir enfermedades cardíacas Plena 1982, Venitt 1986, influir en procesos de envejecimiento Plewa 1982 e inducir mutaciones en células somáticas que pueden desarrollar cáncer Ames 1985a; Ames 1985b; Quillardet 1985.

Antecedentes

En toxicología genética, para determinar la genotoxicidad de un compuesto es requisito probarlo en varias especies y en diferentes tejidos debido a la posibilidad de encontrar compuestos que sea especie-específico o tejido-específico ^{Shelby 1993; Ramírez-Muños 1999}, además, trabajar con organismos vivos permite probar el compuesto y sus metabolitos ^{Rodríguez-Ariza 1992}, por lo que es importante contar con diversas alternativas para el estudio de compuestos genotóxicos ^{Alaoui-Jamali 1989; Hayashi 2000}. Antes de elegir el ensayo a usar se debe definir qué es lo que se va a monitorear y en dónde, si se tiene conocimiento del compuesto o no se dispone de información al respecto, además es importante considerar los recursos con que se cuenta, ya que existen algunas pruebas económicas y rápidas, pero también las hay sumamente costosas; una vez considerados estos puntos, entonces se elige la más adecuada ^{Zúñiga-González 2001}. Actualmente se utilizan diferentes metodologías con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos, como son: el cariotipo, el estudio del índice mitótico, el intercambio de cromátides hermanas, el ensayo cometa, el estudio de la inducción de apoptosis, la prueba de Ames y la prueba de micronúcleos (MN) ^{Zúñiga-González 2001}.

En el presente trabajo se utilizó la prueba de MN en eritrocitos de sangre periférica, que es una prueba sencilla, económica y altamente informativa ^{Heddle 1983; Heddle 1991}.

o Prueba de micronúcleos

Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo en mitosis. En hematología de mamíferos, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, cuya forma es redonda o almendrada, su diámetro varía desde 1/20 a un 1/5 (0.4 a 1.6 μ) del tamaño normal del eritrocito (6 a 8 μ de diámetro) ^{Schmid 1975; Corazza 1990; McDonald 1998} (Figura 1).

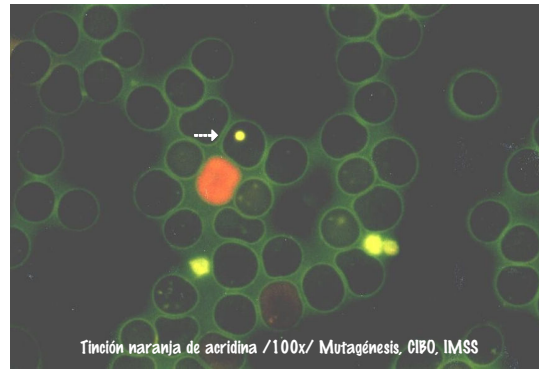


Figura 1. Eritrocitos micronucleados de sangre periférica de mamífero.

La prueba de MN sirve para detectar el efecto de agentes genotóxicos sobre los cromosomas ^{Heddle 1983; Heddle 1991}, permite identificar tanto agentes clastogénicos (rompen cromosomas), como aneuploidogénicos (afectan el huso mitótico) ^{Schmid 1975; Heddle 1978}, y se pueden diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN ^{Yamamoto 1980} y presencia de centrómero ^{Odagari 1994} o cinetocoro ^{Caria 1995}. Su formación 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 MN ^{Schmid 1975} (Figura 2).

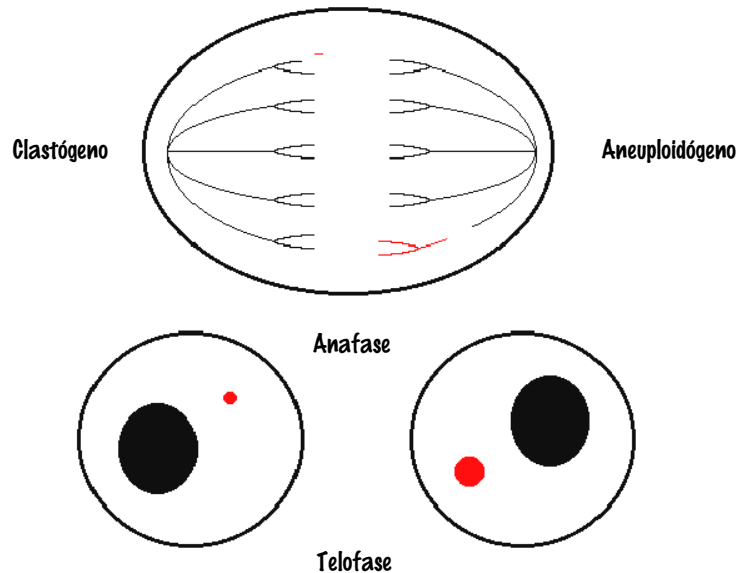


Figura 2. Formación de micronúcleos.

Dentro de las ventajas de la técnica de MN se incluyen facilidad y rapidez, la abundancia de células analizables, y al hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase Schmid 1975; Hart 1983; Heddle 1991. El ensayo de MN se ha realizado en diferentes especies Zúñiga 1996a; Zúñiga 1996b; Zúñiga-González 2000; Zúñiga-González 2001b; Zamora-Perez 2004 y en gran variedad de tejidos (Figura 3), ya que la condición esencial es que el tejido se divida, de esta manera es posible aplicarla en médula ósea, eritrocitos de sangre periférica Schmid 1975; Zúñiga 1996a; Zúñiga 1996b; Tice 1987; Zúñiga-González 2000; Zúñiga-González 2005; Zúñiga-González 2007, linfocitos Hayashi 1990; Herrera 1992, hepatocitos Schmezer 1990, células germinales Russo and Levis 1992, células de mucosa oral de humano Torres-Bugarín 2004, o células de la muda de *Ambystoma* Zamora-Perez 2004. En cuanto a animales de laboratorio, los más comunes son rata Trzos 1978, ratón Heddle 1978; Hayashi 1983; Zúñiga-González 2003a y hámster Heddle 1983, y otros no tan comunes como el gato Zúñiga-González 1998 y algunos primates Choy 1989; Zúñiga-González 2005. Por lo tanto, utilizar organismos bioindicadores que de

manera natural puedan dar información, es una alternativa muy económica y de gran provecho para la salud humana.

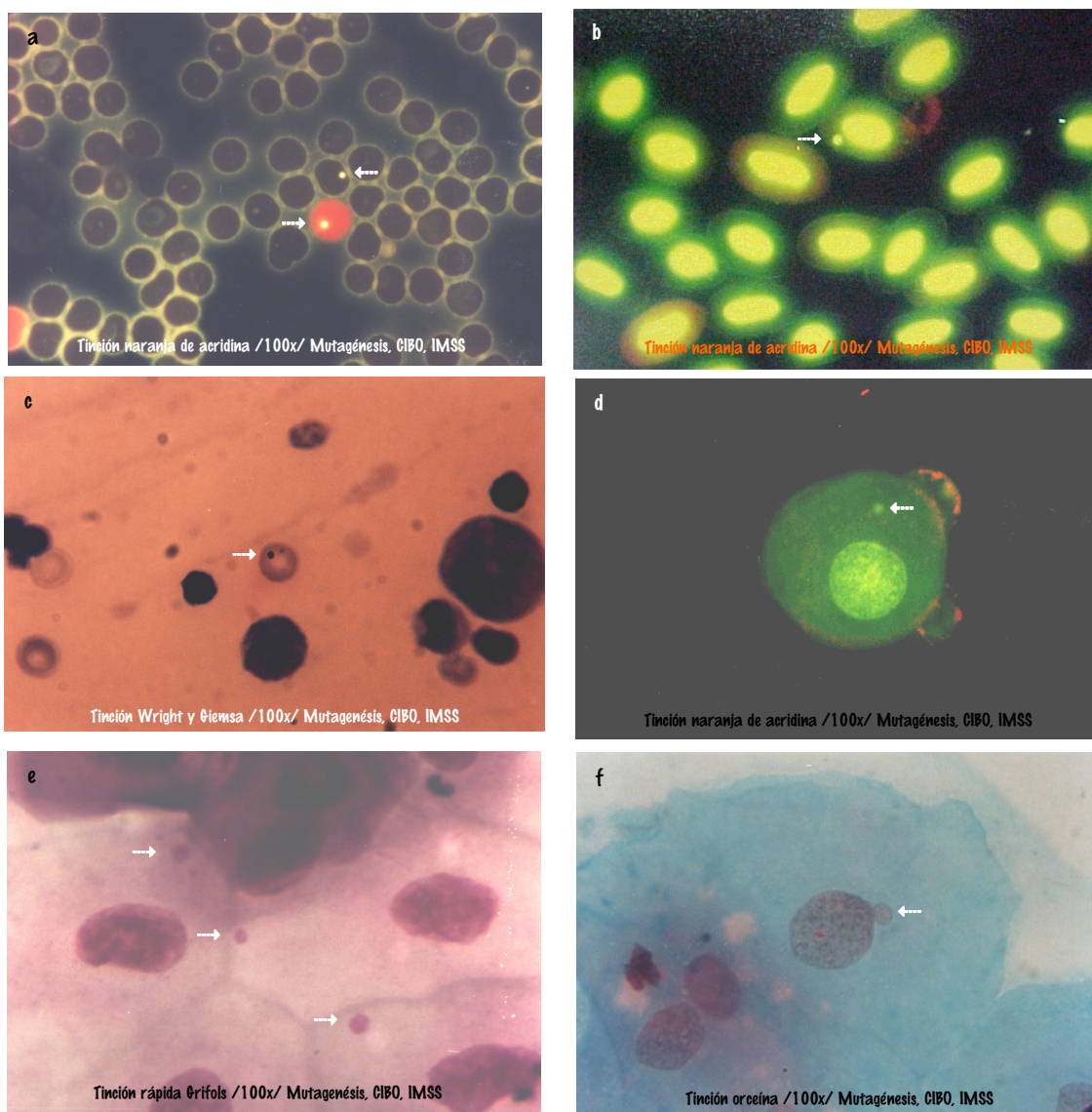


Figura 3. Células micronucleadas en diferentes tejidos. a) Eritrocitos de sangre periférica de mamífero; b) Eritrocitos de sangre periférica de ave; c) Células de muda de anfibio; d) Mucosa oral de humano; e) Médula ósea; f) células de vagina de rata en proestro.

La presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN. Esta técnica entonces, es una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos, así como de carcinógenos ambientales y ocupacionales Torres-Bugarín 1998; Torres-Bugarín 2004, y se puede aplicar en

cualquier lugar sin las limitaciones económicas que se pudieran tener al utilizar pruebas muy sofisticadas y por ende, muy caras ^{Zúñiga-González 1998}.

o **Prolongaciones Nucleares**

El ensayo de MN ha sido ampliamente utilizado por lo fácil y contundente que resulta ^{Schmid 1975; Zúñiga 1996; Hayashi 2000; Zúñiga-González 2001}. Sin embargo, en 1998 se describe en la literatura el término prolongaciones nucleares (PN) (conocidas en inglés como “Buds”) que se refiere a una anomalía nuclear relacionada con células exfoliadas y recientemente se ha presentado la importancia que pueden tener las PN como bioindicadores de exposición genotóxica ^{Serrano-García 2001; Fenech 2002; Montero 2003}.

Las PN, también conocidas como núcleo lobulado, son estructuras similares a los MN en la forma y tamaño, que a diferencia de los MN, están vinculados con el núcleo principal de la célula por un hilo o hebra de cromatina ^{Fenech 2002}. En condiciones normales se pueden observar en células humanas, como por ejemplo en células de mucosa bucal (Figura 4a), linfocitos (Figura 4b y 4c) y eritrocitos nucleados (Figura 4d), aunque parecen ser menos frecuentes que los MN en muchos tipos celulares y se ha descrito que la presencia de las PN está relacionada con los MN o con eventos de exposición a genotóxicos ^{Serrano-García 2001; Montero 2003}.

Sin embargo, hay autores que declinan la idea de que la presencia de estas estructuras está relacionada con eventos de genotoxicidad, debido al argumento de que las PN no se forman en células en división. Más sin embargo, hay estudios que indican que las PN pueden ser consideradas como resultado de un evento genotóxico y que su origen es parecido a la del MN.

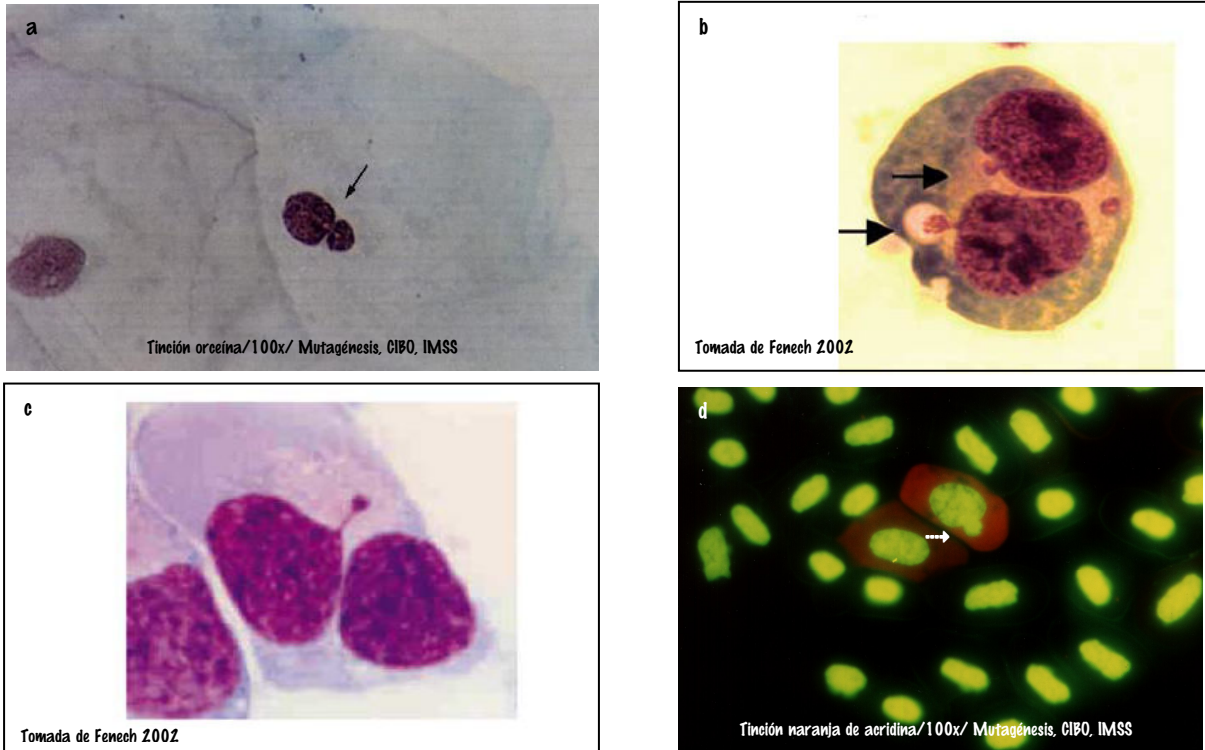


Figura 4. Células con prolongaciones nucleares. a) Célula de mucosa bucal de humano; b) y c) Linfocito binucleado de humano; d) Eritrocito policromático de ave.

Las teorías convencionales asumen que la formación de MN es exclusiva de la división celular. Sin embargo, se ha sugerido que los MN pueden originarse a partir de PN en la interfase (Figura 5).

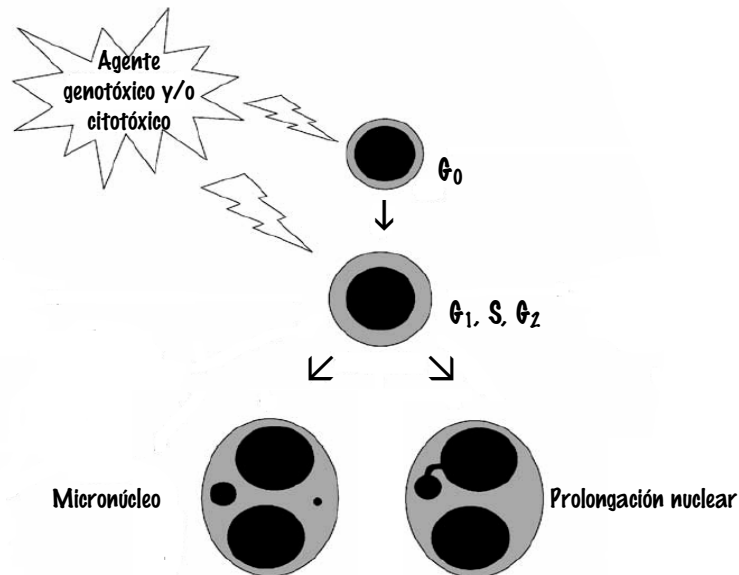


Figura 5. Esquema del posible origen común de los micronúcleos y las prolongaciones nucleares ^{modificado de Lindberg 2007}

El origen de las PN también podría ser explicado por el modelo convencional de la formación de MN, en el supuesto de que se derivan de rezagos anafásicos que de manera independiente forman una envoltura nuclear durante la telofase antes de la integración en el núcleo o a partir de restos de fragmentos de puentes anafásicos ^{Lindberg 2007}. Tanaka y Shimizu ^{Tanaka 2000} han propuesto un modelo para la formación de PN en células COLO 320DM de carcinoma colorectal de humanos, en las que amplifican dobles diminutos que no han podido integrarse al núcleo en otros cromosomas en la mitosis (y que no fueron MN debido a la presencia de membrana nuclear) y son atrapados por la proteína nuclear lámina B en la fase S, durante la reconstitución de la membrana nuclear, cuando lamina B se reconstituye, y así da lugar a las PN. El ADN de estas PN se replica y posteriormente puede ser liberado en el citoplasma como MN. Estas observaciones sugieren que el modelo interfásico y mitótico para la formación de PN podría ser combinado para explicar el posible origen de las PN.

Debido a que las PN podría ser una nueva fuente a partir del cual se formen MN en interfase, es importante comprender su origen y su constitución. Algunos estudios sugieren que las PN y los MN en parte presentan mecanismos diferentes de origen. Las PN parecen estar formadas principalmente por fragmentos cromosómicos acéntricos, con alto porcentaje de fragmentos aparentemente intersticiales, que son raros en los MN ^{Fenech 2003}.

Cuatro modelos se han propuesto para explicar el origen de las PN. Dos de ellos asumen que las PN se forman durante la división celular, ya sea por rezagos anafásicos o por rompimiento de puentes anafásicos. Los otros dos postulan que las PN se originan en la fase S, lo que representa extrusiones del núcleo ya sea de ADN amplificado, de ADN o bien cromatina, en la que su replicación ha fracasado. La formación de las PN a partir de disolución de puentes anafásicos parece ser una explicación atractiva, al asumir que la

forma de tallo típica de las PN es el resultado del rompimiento del puente, cuando este es resuelto (Figura 6). En esta figura 6 se representa el modelo para la formación de MN (parte superior) y PN (parte inferior), a partir de la ruptura de puentes cromosómicos durante la telofase. Los puntos verdes indican ADN centromérico, y los puntos rojos ADN telomérico. La envoltura nuclear se muestra como una línea gruesa negra. El puente en el ejemplo está formado a partir de cromatina dicéntrica y carece de secuencias teloméricas o de centrómero. Cromosomas dicéntricos originados por fusión telomérica, que se asume que es un evento raro en cultivos de células humanas primarias, podría también ser el resultado en puentes con los telómeros del ADN. Uno de las PN mostradas posteriormente forma un MN Lindberg 2007.

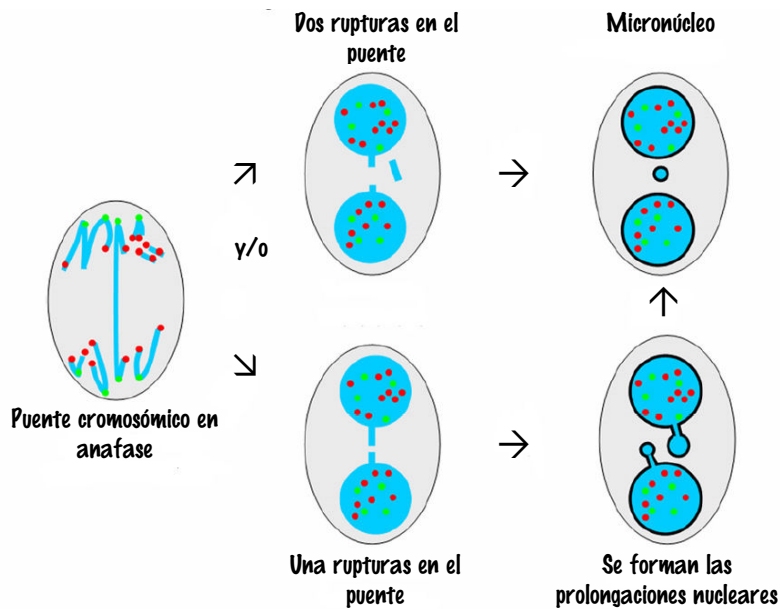


Figura 6. Modelo que ejemplifica la formación de micronúcleos y prolongaciones nucleares a partir de remanentes de puentes anafásicos Modificado de Lindberg 2007.

Debido a lo anterior, se podría proponer que las PN y los MN en linfocitos binucleados humanos presentan mecanismos de origen parcialmente diferentes. Los MN principalmente se originan a partir de fragmentos acéntricos terminales y/o rezagos anafásicos que ocurren

durante la anafase. La mayoría de las PN en linfocitos binucleados parecen originarse a partir de fragmentos intersticiales o fragmentos acéntricos terminales, posiblemente en representación de la membrana nuclear que atrapa al ADN que se ha dejado en el citoplasma después de la división nuclear, o exceso de ADN que se está expulsando del núcleo ^{Lindberg 2007}.

En estudios previos se describió incremento de las PN en cultivo de linfocitos humanos y de cerdo con la administración de diferentes dosis de mitomicina-C (MMC) ^{Serrano-García 001}, así como en cultivos de linfocitos de personas con deficiencia de ácido fólico ^{Fenech 2002}, en células de mucosa bucal de personas expuestas a pesticidas o a drogas antineoplásicas y en células de bovino transformadas por el virus Rous sarcoma y SV40 ^{Elston 1995}.

◦ **Eritrocitos**

Los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) son uno de los elementos de la sangre periférica de los organismos ^{Dorland 1993}. En el hombre, la forma madura del eritrocito adulto normal es un disco bicóncavo, con diámetro promedio de 8 μ y espesor de 2 μ ^{Hillman 1988}. En frotis teñidos se observan como corpúsculos circulares con borde liso ^{Schalm 1964; Hillmsn 1988; McDonal 1998}. El glóbulo rojo está formado por agua, 70%; una matriz de sustancias orgánicas e inorgánicas que forman hasta 5% del volumen del eritrocito, y aproximadamente 25% de su volumen consiste en hemoglobina, la cual realiza la función de transporte de gases (O_2 y CO_2).

Excepto mamíferos, los peces, reptiles, anfibios y aves tienen eritrocitos nucleados y la presencia de PN en las células de estos organismos es común (Figura 7). Las formas de los eritrocitos, dependiendo de la especie, pueden ir desde bicóncavos hasta elípticos ^{Schalm 1964} (Figura 7).

Es normal encontrar variaciones en el tamaño de los eritrocitos, ya que los más jóvenes son un poco más grandes y disminuyen ligeramente con su edad. El eritrocito policromático (EPC) o eritrocito con basofilia difusa recién ha perdido el núcleo, pero aún mantiene un tinte azulado con la tinción de wright y giemsa, y es ligeramente mayor que el eritrocito maduro. Cuando se tiñen con un colorante supravital como el azul de cresil, revelan un retículo granulofilamentoso (polisomas y retículo endoplásmico), por lo que se llaman reticulocitos Reagan 1999.

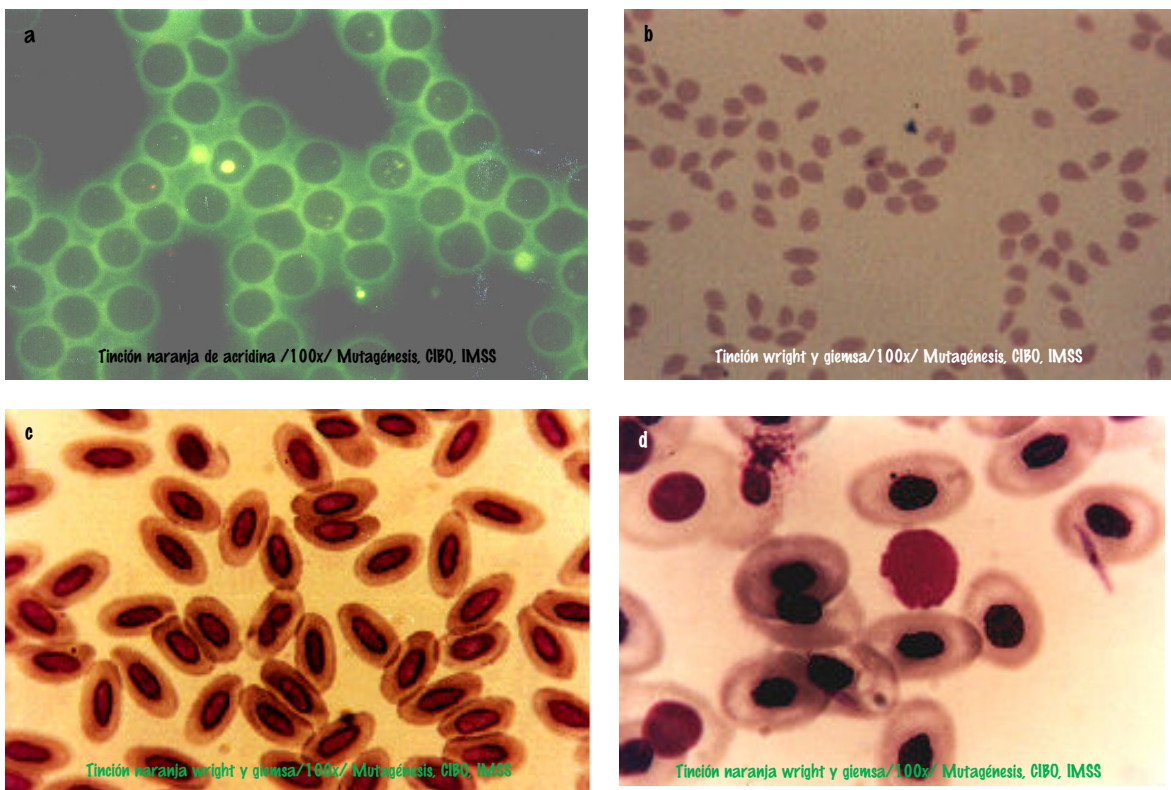


Figura 7. Distintas formas de eritrocitos en diferentes especies. a) Delfin (*Tursiops truncatus*); b) Venado temazate (*Tamazate americana*); c) Tórtola (*Scartasella inca*); d) Sapo (*Bufo horribilis*)

En las pruebas de genotoxicidad por medio del ensayo de MN y/o PN en eritrocitos de sangre periférica se pueden contar los EPC encontrados en la circulación sanguínea para el caso de pruebas de 24 a 48 horas, ya que ésta proporción de células es constante, pero

suele alterarse si el individuo recibe compuestos citotóxicos (valor que puede disminuir hasta quedar en cero), lo que indica mielodepresión. Asimismo, se pueden contar los eritrocitos normocromáticos (ENC) micronucleados para períodos de exposición por mayor tiempo o cuando la especie estudiada no presenta de manera normal EPC ^{Zúñiga-González 1998}. Es importante tomar en cuenta que debido a que los eritrocitos jóvenes (EPC) no pierden los ribosomas por aproximadamente 24 horas después de la enucleación (ya que después de este tiempo se transforman en ENC), estos se tiñen de color azul-gris con el colorante de giemsa o de color rojo con naranja de acridina ^{Heddle 1978; Hayashi 1990}, lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de períodos cortos de exposición (Figura 8).

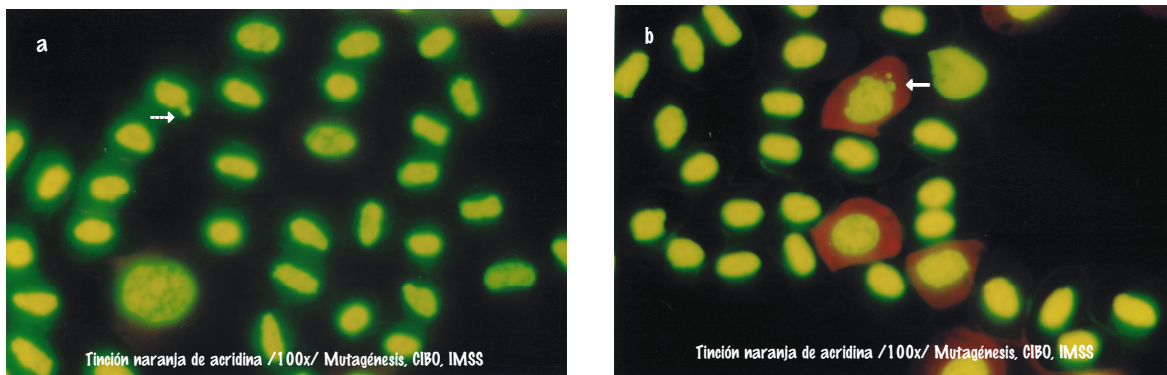


Figura 8. Eritrocitos nucleados. a) Eritrocito normocromático; b) Eritrocito policromático (Ambos eritrocitos presentan prolongación nuclear y el policromático presenta micronúcleo).

o Sistema reticuloendotelial

El sistema reticuloendotelial es el encargado de retirar a los eritrocitos con alteraciones, incluidos los MN, entre otras anomalías presentes ^{Zúñiga 1996b}. El bazo (Figura 9), como parte del sistema reticuloendotelial, filtra la sangre, elimina partículas extrañas mediante células fagocíticas, y destruye o elimina a los eritrocitos viejos o sus fragmentos. Cuando los eritrocitos envejecen, ocurren ciertos cambios que reducen su flexibilidad, esto dificulta su

paso por la microcirculación y en algún momento se produce lisis celular o fagocitosis y eliminación por el sistema reticuloendotelial.

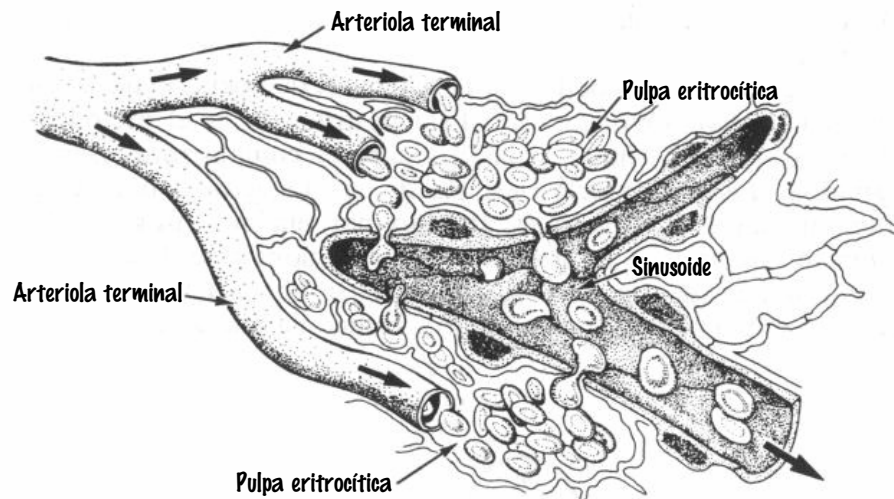


Figura 9. Estructura del bazo ^{Hillman 1987}.

Aunque todas las células reticuloendoteliales participan en la destrucción de los eritrocitos viejos, las del bazo están situadas anatómicamente, de tal modo que son los detectores más sensibles de cualquier anomalía eritrocítica ^{Schalm 1964; Hillman 1987; Hillman 1990}.

En este sentido, existen especies que tienen alta eficiencia de su sistema reticuloendotelial para retirar los eritrocitos anormales, lo que hace que no se puedan observar MN en sangre periférica, mientras que en otras se pueden observar estas estructuras en cualquier momento de su vida ^{Zúñiga-González 2001c}.

En el humano, el número de MN en sangre periférica es prácticamente nulo ^{Schlegel 1986}, pero los podemos observar cuando la persona tiene mal funcionamiento del bazo ^{Schmid 1975; Corazza 1990; Williams 1990; Ramírez-Muñoz 1999}, o cuando ha sido esplenectomizado ^{Pariza 1990; Zúñiga 1996b; Ramírez-Muñoz 1999}. Esta última condición es como se pueden tener los datos precisos cuando se quiere

conocer la genotoxicidad de los medicamentos administrados a los pacientes ^{Zúñiga 1996b; Torres-Bugarín 1999}, sin embargo, cuando el requerimiento es el de probar un nuevo fármaco, razones éticas obvias descartan esta posibilidad y es entonces cuando los bioensayos nos dan la oportunidad de probar dichos compuestos.

Por otro lado, se ha descrito que la variabilidad en el número de EMN está influenciada por la edad ^{Odagiri 1998; Peace 1999; Wojda 2003}; pacientes esplenectomizados adultos y niños, mostraron diferencias en el número de EMN en sangre periférica, siendo mayor en adultos con respecto a niños ^{Zúñiga 1996b; Torres-Bugarín 1999}. Estudios en roedores apoyan lo anterior, pues se ha encontrado que la frecuencia de espermátides micronucleadas es más alta en ratones y hámsters viejos cuando se comparan con jóvenes ^{Lowe 1995; Allen 1996}. Contrariamente, además han sido descritas diferencias en el número de EMN espontáneos debidas a la inmadurez del sistema reticuloendotelial en etapas juveniles, por lo cual son entonces incapaces de retirar de la circulación estas estructuras y conforme el organismo madura se va haciendo más eficiente, tal que puede removerlos de la circulación hasta ser casi imperceptibles en su etapa adulta ^{Zúñiga 1996a; Zúñiga 1996b; Zúñiga-González 2001c}. Asimismo, en la literatura se ha descrito que la sensibilidad para la inducción de MN respecto al sexo, puede ser atribuible a diferencias enzimáticas y/o hormonales encontradas entre machos y hembras ^{Meyne 1980; Nagae 1991}.

o **Agentes Genotóxicos**

Los compuestos que dañan al ADN pueden ser clasificados, con base en su mecanismo de acción:

Clastogénicos: inhiben la síntesis del ADN y ocasionan posteriormente ruptura de enlaces, que termina por producir fracturas cromosómicas ^{Beaula 1991}, como por ejemplo antimetabolitos (Metotrexato), inhibidores de la topoisomerasa (Etopósido), agentes

alquilantes (Mitomicina, Ciclofosfamida) ^{Zúñiga-González 2003b}, análogos de base (5-Fluorouracilo)

^{Zúñiga-González 2003a} o intercalarse en el ADN (Naranja de acridina) ^{Hayashi 1990; úñiga-González 2003b},

Aneuploidogénicos: inhiben la división celular, ya que bloquean la formación del huso mitótico al unirse covalentemente a la proteína tubulina, lo que origina de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos ^{Pearson 1978; Yamamoto 1980; Iwai 1990; Williams 1990}, como por ejemplo, la colchicina, vincristina y vinblastina.

A continuación se describen brevemente los compuestos utilizados en el presente trabajo para inducir tanto PN como MN en los organismos utilizados.

Mitomicina-C (MMC). La MMC es un compuesto alquilante clastógeno (Figura 10a y 10b); considerada como carcinogénica y mutagénica ^{Ortiz 2004}, además es un conocido agente micronucleogénico y recientemente se ha observado la formación de PN en cultivo de linfocitos de cerdo y humano ^{Serrano-García 2001}, por lo que es utilizada como testigo positivo en pruebas de genotoxicidad ^{Madrigal-Bujaidar 1996}. La MMC es derivada de la bacteria *Streptomyces caespitosus* y es un antibiótico que cuando es activado, actúa como agente alquilante del ADN. Esto resulta en el desapareamiento de las bases, rompimiento en la cadena de ADN y uniones cruzadas de cadenas complementarias, que previene la síntesis del ADN. La ARN polimerasa dependiente del ADN también es inhibida, lo que disminuye la transcripción ^{McVan 1995}. La MMC se absorbe bien por vía intravenosa ^{Rodríguez-Carranza 2000}, aunque se puede administrar por vía intraperitoneal (i.p.) ^{Jena 1995}. Se distribuye por todo el organismo pero no cruza la barrera hematoencefalica, se biotransforma en hígado, riñón, bazo y corazón, se elimina en orina y heces y su vida media inicial es de 5 a 15 minutos y la terminal de 50 minutos ^{McVan 1995}.

Ciclofosfamida (CF). La CF ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) es un compuesto alquilante clastógeno (Figura 10b y 10c) químicamente relacionado con la mostaza nitrogenada; está considerada como

carcinogénica, mutagénica y teratogénica, además la CF es un conocido agente micronucleogénico, por lo que es utilizada como testigo positivo en pruebas de genotoxicidad Lähdetie 1983, Rodríguez-Carranza 2000. Es una droga que requiere activación hepática inicial por el sistema de las oxidasas del citocromo P450 para adquirir propiedades citotóxicas. Su actividad antitumoral depende de su biotransformación en mostaza fosforamida y acroleína. Estas formas activas alquilan o se unen con diversas estructuras intracelulares, como los ácidos nucleicos. Aún cuando no se conocen detalles del proceso, su acción citotóxica final depende de la formación de enlaces cruzados con las cadenas de ADN y ARN y de la inhibición de la síntesis de proteínas. Esto produce desequilibrio en el crecimiento intracelular, lo que conduce a la muerte celular.

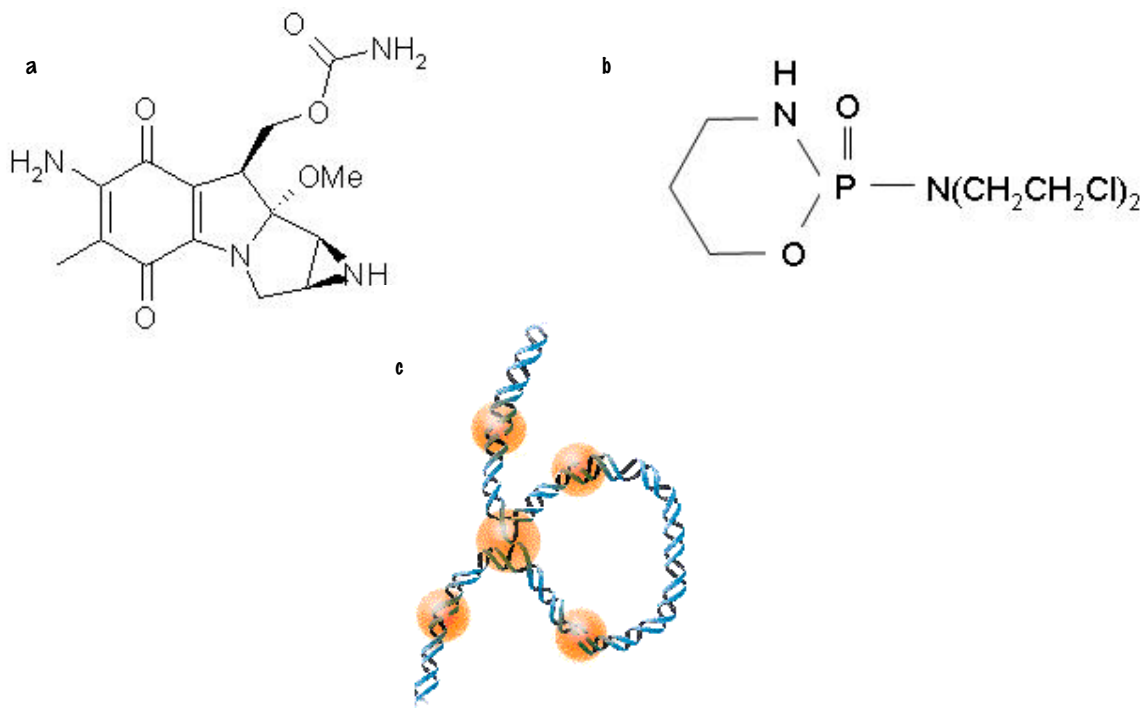


Figura 10. Agentes genotóxicos. a) Estructura química de la mitomicina-C; b) Estructura química de la ciclofosfamida; c) Mecanismo de acción: Agente alquilante.

Su acción es inespecífica sobre el ciclo celular y su efecto se manifiesta cuando la célula entra en fase G2 (premitótica). La CF se absorbe bien por v.o., aunque se puede administrar por vía intravenosa o intramuscular. La vida media plasmática varía de 4 a 6 ½ horas en humanos, aunque por vía oral (v.o.) el nivel pico se observa en una hora ^{McVan 1995; Smith 1998;}
Rodríguez-Carranza 2000.

o **Bioindicadores**

El monitoreo ambiental es por naturaleza una actividad a largo plazo, pieza fundamental para describir el estado del ambiente y sus tendencias. Los programas de monitoreo ambiental comprenden períodos prolongados de tiempo, por lo que deben ser lo suficientemente flexibles como para adaptarse a situaciones nuevas, imprevisibles o temporales, tanto de origen natural como humanas, cuyas consecuencias necesiten ser evaluadas. Los organismos vivos han sido utilizados como bioindicadores de contaminantes medioambientales. El valor de la biota en los programas de monitoreo está relacionado con la integración a la exposición del contaminante y los efectos a través del tiempo y espacio. Debido a las ventajas que presenta el utilizar 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 de daño genotóxico. Para el caso particular de la prueba de MN, estos organismos deberán responder formando EMN en número suficiente como para que al exponerlos al probable agente genotóxico se observe incremento significativo en el número de MN. El planteamiento es que si una especie presenta EMN en buen número (6 ó más en 10,000 eritrocitos) es debido a que el sistema reticuloendotelial no tiene estricto control sobre éstos y por lo tanto, lo esperado es que si a estos organismos se les expone a agentes genotóxicos, el número de EMN se incremente ^{Zúñiga 1996; Zúñiga-González 1998,} lo que

permitiría detectar genotóxicos micronucleogénicos mediante el estudio comparativo de los EMN de la sangre periférica de estas especies.

En la prueba de MN se pueden utilizar animales de laboratorio para los diferentes agentes a probar, los más comunes son rata ^{Trzos 1978; Zúñiga-González 2003b}, ratón ^{Hart 1983; Hayashi 1990; Zúñiga-González 2003a} y hámster ^{Heddle 1991} y otros no tan comunes como el gato ^{Zúñiga-González 1998}, ardilla ^{Zúñiga-González 2001b} y algunos primates ^{Choy 1993; Zúñiga-González 2005} o aves como los pollos, con las que se puede tener también un sistema *in vivo* mediante el estudio de su médula ósea ^{Bhunya 1992; Jena 1995}. En el caso de los anfibios cuyos eritrocitos son grandes, aproximadamente 30 μ a diferencia del eritrocito de mamífero que mide 8 μ , la observación de MN es fácil. El ensayo de MN se ha realizado en eritrocitos de sangre periférica de larvas, como los de rana (*Rana temporaria*), que resultó ser más sensible que el sapo (*Xenopus laevis*) ^{Rudek 1992}, de igual manera, se ha empleado a los renacuajos de *Rana catesbeiana* ^{Campana 2003}, además del primer anfibio usado como biomonitor *Pleurodeles waltl* ^{Jaylet 1986} y recientemente se ha propuesto realizar el ensayo de MN en células de muda de *Ambystoma sp.* ^{Zamora-Perez 2004}. Un buen número de peces Teleosteos han sido propuestos, como la trucha *Oncorhynchus mykiss*, el pez Japonés *Oryzias latipes*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*, ^{Al-Sabti 1995} o *Umbra pygmaea*, éste último de reducida distribución geográfica ^{Krauter 1987}.

Los invertebrados también se han utilizado como biomonitores, es el caso de la ostra *Crassostrea gigas*, en la cual el estudio se realiza en hemocitos, asimismo, son utilizadas las branquias de otros bivalvos ^{Rodríguez-Ariza 1992; Burgeot 1995; Waldmann 1995}. Por último, las plantas se toman en cuenta cada vez más ya que, de manera similar, pueden manifestar daño por agentes contaminantes de efecto genotóxico con la formación de MN, así es el caso de *Vicia faba* y *Allium cepa*, en la que se utilizan los meristemas de la raíz para la observación

de los MN Burgeot 1995; Grant 1992; Ma 1995 o Tradescantia en la que se utiliza el polen Ruiz 1992; Herman 1995; Zúñiga 1996.

Por lo tanto, utilizar organismos que de manera natural puedan dar información acerca del medio ambiente en donde se encuentra la especie de interés, resulta de gran provecho y muy económico Zúñiga-Gonzalez 1991; Zúñiga-Gonzalez 1998; Zúñiga-González 2002; Zamora-Perez 2004; Zúñiga-González 2005. De ahí la importancia de contar con bioindicadores que den información de manera directa y rápida, y a la vez conservar la vida y el hábitat de la especie. En estudios previos del Laboratorio de Mutagénesis (IMSS), se han identificando especies que presentan de manera espontánea un buen número de MN, con la finalidad de proponerlas como bioindicadores para evaluar el posible efecto genotóxico de los compuestos Zúñiga 1996a; Zúñiga-González 2000; Zúñiga-González 2001a; Zúñiga-González 2001c; Zúñiga-González 2002; Zúñiga-González 2005.

En el caso de especies con eritrocitos nucleados que se han muestreado con este fin, las que han presentando MN en buen número han sido, dentro del grupo de las Aves, el perico atolero (*Aratinga canicularis*) con 5.1 EMN/10,000 eritrocitos y el Tecolote (*Otus asio*) con 10.6 EMN/10,000 eritrocitos Zúñiga-González 2000 y dentro del grupo de los reptiles, el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) que presentó 3.0 EMN/10,000 eritrocitos Zúñiga-González 2000. Sólo estas 3 especies con eritrocitos nucleados de 44 muestreadas presentaron EMN espontáneos, más sin embargo presentan PN espontáneas en buen número, por lo que las especies con eritrocitos nucleados no estarían descartados para ser utilizadas como bioindicadores de agentes genotóxicos mediante el incremento de PN.

o **Perico atolero (*A. canicularis*; Linnaeus, 1758)**

El perico atolero o del Pacífico Mexicano(*A. canicularis*), es un perico pequeño con la parte superior del cuerpo verde brillante, más amarillo y claro por debajo y con un tinte oliva en

el pecho; la frente es naranja o amarillo-naranja (reducido en los juveniles) y presentan un parche color azul opaco en la corona. El forro de las alas es oliva amarillento y las remeras azules en su mayoría, al igual que la punta de su larga cola. El iris es amarillo y el anillo ocular desnudo es amarillo naranja. Tienen el pico ganchudo, fuerte y blancuzco; las patas son color grisáceo apagado, con dos dedos hacia delante y dos hacia atrás, lo que les permite agarrarse bien de las ramas de los árboles. Miden aproximadamente 24 cm y pesan aproximadamente 80 gr (Figura 11). Se alimenta principalmente de granos, semillas, frutos, flores, insectos, papillas diversas. Su nombre se debe a que cuando son jóvenes, en cautiverio se acostumbra criarlos alimentándolos con atole de maíz. Su reproducción es sexual, ovípara: el periodo de incubación es de 25 días y la puesta consta de 3 a 6 huevos. Tienen de dos a cuatro polluelos y se reproducen tres veces al año en forma silvestre y una en cautiverio. Viven aproximadamente 25 años en promedio. Son animales terrestres y por su naturaleza, se adaptan únicamente a las zonas con clima tropical y templado. Es frecuente encontrarlo en sabanas con árboles dispersos, bosques secundarios, bordes de bosque y en el dosel de bosques deciduos o siempre verdes

<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/280/atolero.html>



Figura 11. Perico atolero (*A. canicularis*).

En México se encuentran en la vertiente del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas y en Centroamérica hasta Costa Rica (Figura 12).



Figura 12. Distribución geográfica del perico atolero Tomado de www.gbif.net, 2008-11-25.

Como su hábitat es en el clima tropical y templado, pueden ser observados en selvas medianas caducifolias y subcaducifolias; así como también en cultivos de frutas, maíz y sorgo. Son muy sensibles a los cambios bruscos del medio ambiente y son organismos que se adaptan fácilmente a las condiciones de cautiverio, por lo que su estancia en el laboratorio no es problema <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/280/atolero.html>.

En investigación, las aves se han utilizado como organismos bioindicadores, Bhunya y Jena Bhunya 1992; Jena 1995 utilizaron crías de pollos para determinar el potencial mutagénico del monocrotofó, un plaguicida organofosforado, mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas y la prueba de MN en células de médula ósea y en eritrocitos de sangre periféricas, la desventaja de este estudio es la toma de muestra de médula ósea, ya que para poder obtener las células hay que sacrificar a los organismos. En otro trabajo se analizó el número de eritrocitos micronucleados en polluelos de garza (*Ardea purpurea*, *Egretta garzetta* y *Bubulcus ibis*) de la cuenca del Ebro, España, para evaluar el impacto de la contaminación en el hábitat natural de estas poblaciones de aves Quirós 2008.

◦ **Cocodrilo de pantano (*C. moreletii*; Dumeril y Bibron, 1851)**

Se distingue por ser de tamaño promedio menor entre 3 a 3.5 m y las crías al nacer entre 25 y 30 cm. La cabeza es aplanada y ancha, su hocico relativamente corto y bastante redondeado en la punta. Su longitud es 1.5 a 1.7 veces el ancho basal. Dientes de tipo tecodonto, cinco dientes premaxilares, 13 ó 14 maxilares y 15 mandibulares, sutura interpremaxilar considerablemente más corta que el ancho sumado de los premaxilares.

Algunos ejemplares maduros presentan un par de crestas transversales frente a los ojos, que se unen a la mitad dorsal de la mandíbula superior. En el cuello tiene cuatro o más escudos postoccipitales y 6 ó más nucales. Las escamas ventrales tienen glándulas foliculares y sin botones osteodérmicos. Cola redondeada al principio y posteriormente comprimida, sobretodo en la porción distal. Presenta verticilos intercalados en la parte ventral de la cola

Álvarez del Toro 1974; Sigler 1995 (Figura 13).

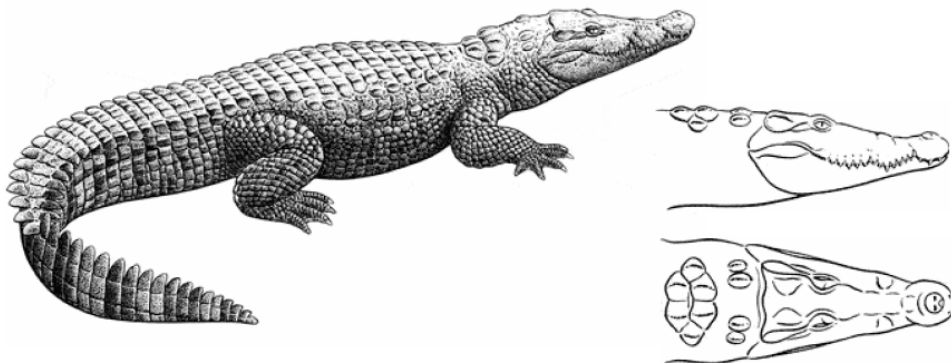


Figura 13. Características morfológicas del cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) Tomado de: Guía de identificación de CITES-Cocodrilos 2000¹.

Se tienen registros de su distribución en los Estados de Chiapas, Campeche, Colima, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Quintana Roo, Yucatán, Veracruz y como una especie introducida en Sinaloa y Colima (Figura 14).



Figura 14. Distribución geográfica del cocodrilo de pantano Tomado de Casas-Andrea 2003.

Esta especie de cocodrilo se encuentra en áreas tropicales, desde luego cálidas y húmedas, con temperatura media anual por arriba de los 22°C, con precipitación anual de 2000 mm o más. El hábitat se ha descrito en forma general, considerándosele primariamente de agua dulce, la que consiste en pantanos, estanques o humedales, arroyos, ciénegas, lagunas, ríos de corriente lenta y raras veces en ríos caudalosos, existiendo algunos registros por parte de pescadores, que hablan de la presencia de este cocodrilo en aguas salobres. Se describe también que es frecuente encontrar a la especie en aguas con poca corriente o estancadas, que pueden ser claras o turbias, con abundante vegetación acuática enraizada o flotante y poco profundas Álvarez del Toro 1974; Sigler 1995.

En México, estos hábitats se encuentran en la porción tropical de la Costa del Golfo de México, hasta altitudes posiblemente de 500 m y del Caribe, en lugares con temperatura media anual entre los 26 y 28°C, con temperatura mínima media anual de 18°C y en sitios libres de heladas. La precipitación media anual de los lugares donde se encuentran estos animales varía entre 600 y 4000 mm Álvarez del Toro 1974; Sigler 1995.

En términos generales y como las otras especies de cocodrilos del país, ésta es relevante por su importancia en el ámbito económico, ecológico y cultural. Esta especie, como la de otros cocodrilianos, han soportado la intensa explotación por más de un siglo. El producto más cotizado es su piel, aunque en la actualidad se realiza la explotación de la carne y otros órganos y partes.

Ecológicamente algunos han considerado a los cocodrilos como especies paraguas, ya que se encuentra en la parte más alta de la cadena de alimentación, siendo un depredador selectivo de presas a lo largo de su vida, lo que le permite el control de otras poblaciones de animales en su entorno y el reciclado de nutrientes importantes en el ambiente. Con sus hábitos cavadores y sus movimientos habituales, forman canales y reservorios de agua en la época de sequía que sirven de refugio a aves acuáticas y otros animales asociados al agua.

Los individuos pequeños se alimentan de insectos, caracoles, crustáceos, babosas y peces pequeños. Los adultos consumen diferentes especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces ^{Aguilar 2001}.

El cocodrilo como especie es un recurso natural valioso, debido a su representatividad en los grupos taxonómicos, a su posición en las cadenas tróficas, así como a sus características territoriales.

En investigación, el cocodrilo ha sido utilizado en estudios tipo ecosistémicos, en los cuales se toman como base los eslabones de las cadenas alimenticias de algunas especies silvestres, como es el caso del cocodrilo, para ser utilizado como indicador de contaminación, como por ejemplo de DDT. Como ejemplo de lo anterior, se cuenta con un estudio realizado en las costas de Oaxaca, en el municipio de Pochutla, en el que determinaron DDT y sus metabolitos en sangre de ejemplares de cocodrilo de río (*C. acutus*) ^{Loa-Loza 2007}, en otro estudio se determinó el valor basal de MN, así como el número de células con cometas en

una población de *Caiman latirostris*, proponiendo a este organismo como potencial bioindicador de agentes genotóxicos, por medio de los ensayos antes mencionados ^{Polenta 2008}.

Las PN se han observado en diferentes tipos celulares y se han asociado con exposición a genotoxícos, sin embargo, estas estructuras no se han sistematizado debidamente como indicador de exposición a agentes genotóxicos, por lo que en el presente trabajo, se eligieron dos especies con eritrocitos nucleados: perico atolero (*A. canicularis*) y cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), con base en su uso previo en el monitoreo de contaminantes, su situación como recurso natural valioso, su representatividad en los grupos taxonómicos, su posición en las cadenas tróficas, así como a las características territoriales de cada una, para probarlos con un genotóxico conocido ^{Madrigal-Bujaidar 1996}, como la MMC o CF y verificar si tanto el número de PN como el de MN incrementan en eritrocitos de sangre periférica, como previamente fue observado en cultivo de linfocitos humanos y de cerdo con la administración de MMC ^{Serrano-García 2001}, lo que indicaría si los eritrocitos nucleados en general responden al genotóxico mediante la formación de eritrocitos con PN. Al mismo tiempo se contarán los eritrocitos micronucleados (EMN) que se formen para comparar este valor con el obtenido para las PN y determinar si alguno de los dos parámetros se manifiesta en mayor número. Por lo que posterior a la demostración del modelo bajo condiciones de laboratorio, se contará con una nueva alternativa para detectar compuestos genotóxicos en el ambiente, por medio de la observación del incremento de PN en los eritrocitos de las especies propuestas.

Cabe señalar en este momento y de manera general que no todas las especies son útiles para emplearse en la evaluación de genotóxicos por medio de la prueba de MN, así mismo

que tanto esta prueba, como las investigaciones que se realizan con animales en el laboratorio en el área de toxicogenética, permiten establecer estimaciones del riesgo genético potencial, siendo estas de las denominadas pruebas tamiz ^{Rodríguez-Arnaiz 1995}.

Planteamiento del Problema

El efecto nocivo de los contaminantes es cada vez mayor sobre los ecosistemas, por lo que el monitoreo de éstos y el tener nuevas alternativas sencillas, rápidas, económicas y confiables para su detección son indispensables.

Por otro lado, en nuestro país no existen programas rutinarios de monitoreo sobre contaminantes, en consecuencia no se tienen inventarios formales de los mismos y se desconocen los mecanismos de transporte, rutas y acumulación en los ecosistemas receptores; tampoco se tiene un conocimiento pleno sobre su exposición, efectos genotóxicos y riesgos implicados, por lo que el monitoreo debe ser una herramienta que nos permita evidenciar en principio la presencia de estos compuestos y sus efectos en los diversos ecosistemas y en los organismos que allí se desarrollan. Recientemente se ha descrito que las PN observadas en cultivo de linfocitos humanos, están relacionadas con exposición a agentes genotóxicos, aunque la información existente al respecto aún es escasa y no existen pruebas *in vivo*, ni modelos animales para su estudio. En trabajos anteriores que se han realizado en el laboratorio de Mutagénesis (IMSS) con aves y reptiles se han observado EPN. Por lo que, en el presente trabajo, se pretende aprovechar esta característica para demostrar que el eritrocito nucleado puede ser útil en estudios de genotoxicidad, tanto en el laboratorio como en trabajos de campo, mediante el conteo de PN, al mismo tiempo que se considerará el aumento de los EMN y se compararán ambos parámetros.

Por lo que se plantean las siguientes preguntas:

¿Se incrementan los eritrocitos con prolongaciones nucleares cuando se administra un genotóxico conocido?

¿Los eritrocitos con prolongaciones nucleares incrementan significativamente más que los eritrocitos micronucleados en presencia de un genotóxico conocido en las especies seleccionadas?

Hipótesis

La exposición a un genotóxico conocido, incrementa el número de EPN en las especies seleccionadas, efecto que puede utilizarse para el monitoreo *in situ* de compuestos genotóxicos en el ambiente.

Los eritrocitos con prolongaciones nucleares incrementan significativamente más que los eritrocitos micronucleados en las especies seleccionadas.

Objetivos

General

Demostrar que los eritrocitos con prolongaciones nucleares son un parámetro indicador de genotoxicidad en especies con eritrocitos nucleados como el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) y el perico atolero (*A. canicularis*).

Particulares

- Establecer los valores basales de eritrocitos con prolongaciones nucleares; eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos en cada una de las especies seleccionadas.
- Inducir el incremento de eritrocitos con prolongaciones nucleares, eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados, con la administración de tres diferentes dosis de un genotóxico conocido como la mitomicina-C en el perico atolero (*A. canicularis*).
- Inducir el incremento de eritrocitos con prolongaciones nucleares, eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados, con la administración de tres diferentes dosis de un genotóxico conocido como la ciclofosfamida en el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*).
- Comparar el incremento de prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados en eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos en cada una de las especies estudiadas.
- Verificar la sensibilidad de los parámetros: eritrocitos con prolongaciones nucleares vs eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares, eritrocitos con prolongaciones nucleares vs eritrocitos micronucleados, eritrocitos micronucleados vs eritrocitos

policromáticos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados vs eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares, en cada una de las especies estudiadas.

Materiales y métodos

◦ **Sede**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número de registro otorgado por el comité local de investigación: 13052006-04 (Anexo A) y en el Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS), de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Guadalajara, Jalisco, México.

◦ **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 testigo negativo: **Comparativo**.

◦ **Definición de variables**

Independiente: Administración de MMC y CF.

Dependiente: Número de EMN y EPN.

◦ **Criterios de inclusión**

Organismos aparentemente sanos de las especies seleccionadas, de sexo indistinto.

◦ **Criterios de exclusión**

Organismos que durante el experimento enfermaron o murieron, así como las muestras que no pudieron ser analizadas por alguna causa.

◦ Selección de los organismos

Los organismos fueron aparentemente sanos, de sexo indistinto y cuando fue posible, de pesos y edades similares. Al llegar al laboratorio fueron identificados con una marca según la especie y registrados en una bitácora con el mayor número de datos que se pudo obtener. Antes de iniciar la parte experimental se les mantuvo por un mínimo de 10 días para su adaptación a las condiciones del laboratorio. Los organismos de cada especie fueron colocados en alojamientos adecuados a la especie, con agua y alimento *ad libitum*.

Los organismos vivos de perico (*A. canicularis*) y cocodrilo (*C. moreletii*) fueron proporcionados por la SEMARNAT.

Los *A. canicularis* fueron facilitados por el CIVS “Guadalajara”, organismo dependiente de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la SEMARNAT; estas aves fueron manejadas en las instalaciones del CIVS y el procedimiento de laboratorio fue realizado en el CIBO. Se utilizaron 28 pericos atoleros de ambos sexos y peso variable (75.9 ± 5.9 gr).

Los pericos fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 7 aves cada uno ^{Hayashi 2000} (testigo negativo y tres grupos experimentales) y fueron alojados en jaulas de acero de 54x30x36 cm (Figura 15), con agua y alimento, que consistió en semillas de girasol y fruta.



Figura 15. Alojamiento de los pericos.

Para el experimento con *C. moreletii* se utilizaron 20 animales de ambos sexos y con peso promedio de 66.5 ± 29.0 gr y talla de 31.0 ± 4.5 cm, los cuales fueron colectados en la laguna de Alcuzahue, municipio de Tecomán, Colima, localizado a $18^{\circ}54'47''\text{N}$ $103^{\circ}46'36''\text{O}$ (Figura 16), bajo autorización de la Dirección General de Vida Silvestre, otorgada en los Oficios No. SGPA/DGVS/11943 y SGPA/DGVS/04026 (Anexo B); los organismos fueron suministrados por el CIVS “Guadalajara” y manejados en el CIBO con la autorización del Oficio SGPA/DGVS/01373/06 (Anexo C), bajo la modalidad de Depósito Administrativo para Investigación.

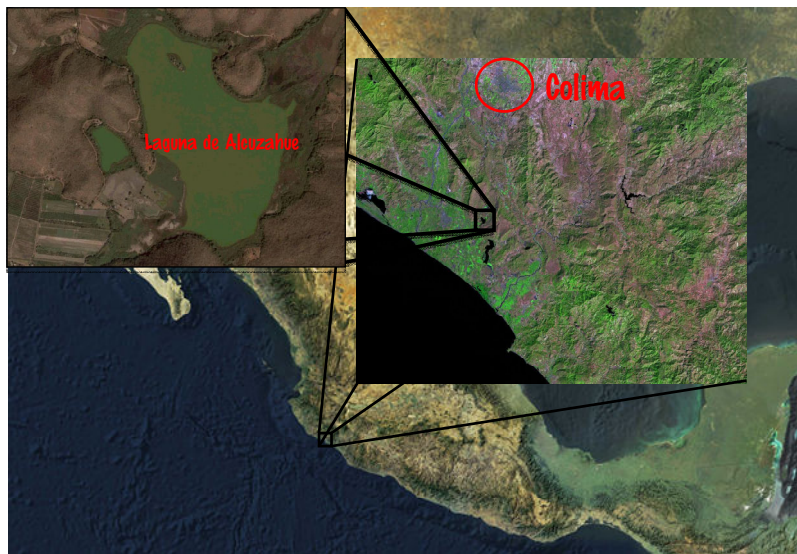


Figura 16. Localización de la laguna de Alcuzahue, Colima, México.

Los *C. moreletii* colectados fueron crías nacidas en la temporada reproductiva 2005, de ambos sexos, los cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de laboratorio y fueron alimentados con neonatos de rata y ratón, procedentes del bioterio del CIBO (IMSS). Por tratarse de organismos poiquiloterms, en los cuales su metabolismo es influenciado por la temperatura ambiente, se diseñó e implementó un sistema que permitió mantener la temperatura constante en su albergue, durante el período de aclimatación

(Figura 17). Para esto construyó un mecanismo que permitió lograr este objetivo y así, la temperatura a la cual se decidió llevar a cabo la inducción con el genotóxico, así como el mantenimiento del grupo testigo negativo fue a 30°C, sin variaciones durante todo el experimento, ya que esta es la temperatura promedio a la que se encuentra el agua en la laguna de Alcuzahue.



Figura 17. Alojamiento de los cocodrilos: a) Vista de cerca del contenedor donde se alojaba a los cocodrilos; b) Vista en general del sistema diseñado para el alojamiento de los grupos de trabajo de cocodrilos.

Una vez que se establecieron las condiciones adecuadas en el laboratorio, los cocodrilos fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos con cinco cocodrilos cada uno ^{Hayashi 2000} (testigo negativo y tres grupos experimentales). Los organismos tenían al momento de la fase experimental aproximadamente de 6 meses de edad.

o **Inducción de MN y PN con MMC en el perico atolero (*A. canicularis*).**

Para la inducción de PN y MN, a los organismos se les administró una inyección vía intracelómica (i.c.) (Figura 18a) de una de las tres diferentes dosis de MMC/Kg ^{Jena 1995} [CAS No. 50-07-7; Sigma, St Louis, Missouri, USA], cada 24 h por 2 días, todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 0.2 ml con agua inyectable (Cuadro 1). Se obtuvo una gota

de sangre a las 0, 24, 48 y 72 h a partir de la primera administración, mediante corte de garra (Figura 18b), el grupo control sólo recibió el mismo volumen de agua inyectable i.c.

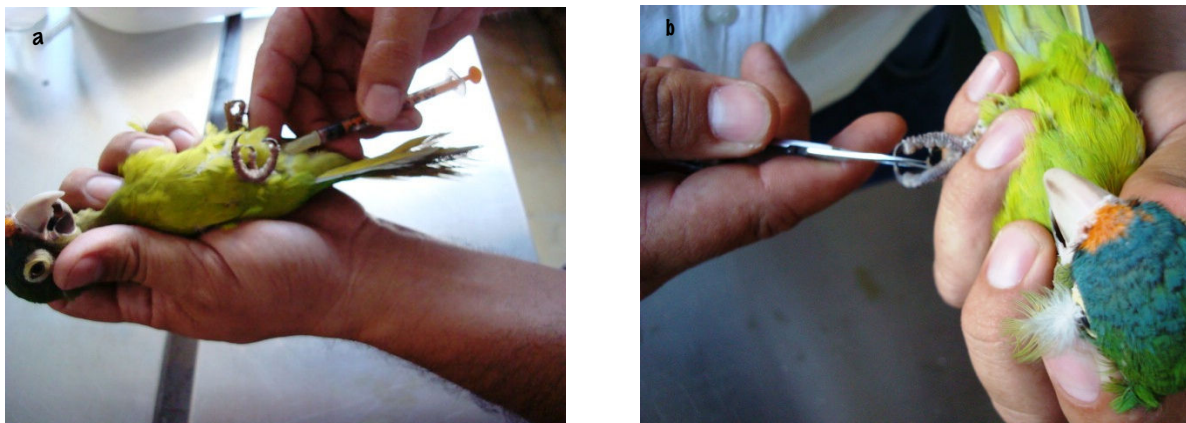


Figura 18. Manejo del perico atolero. a) Inyección i.c.; b) Obtención de gota de sangre por medio de corte de garra.

Cuadro 1. Formación de grupos, dosis y tiempo de exposición para la inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados en el perico atolero.

Grupo	n	Dosis	Tiempo de exposición	Vía de administración
1 (<i>Testigo negativo</i>)	7	200 μ l de agua inyectable	Cada 24 h/ 2 días	i.c.
2	7	2 mg de MMC/Kg	Cada 24 h/ 2 días	i.c.
3	7	3 mg de MMC/Kg	Cada 24 h/ 2 días	i.c.
4	7	4 mg de MMC/Kg	Cada 24 h/ 2 días	i.c.

Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 200 μ l con agua inyectable. MMC: Mitomicina-C; n: tamaño de la muestra; i.c.: intracelómica.

o **Inducción de MN y PN con CF en el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*).**

Para la inducción de PN y MN, a cada organismo se le administró v.o. (Figura 19a) una de las tres diferentes dosis de CF ^{Gómez-Meda 2004} (CF; No. CAS 6055-19-2; SIGMA), cada 24 h por 2 días; todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 0.5 ml con agua inyectable. Se obtuvo una gota de sangre a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la primera dosis administrada, mediante corte de garra (Figura 19b), el grupo control sólo recibió 0.5 ml de agua inyectable v.o.

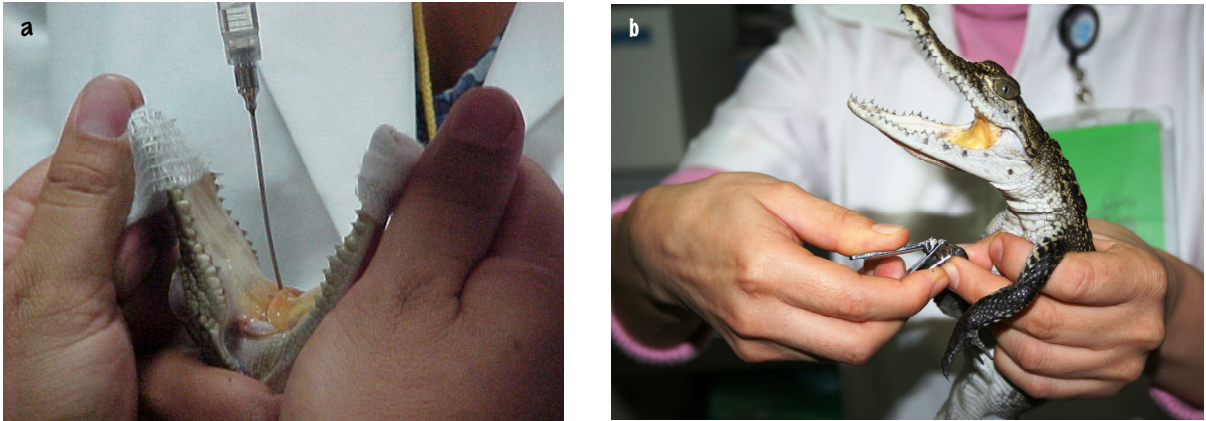


Figura 19. Manejo del cocodrilo de pantano. a) Administración v.o.; b) Obtención de gota de sangre por medio de corte de garra.

Cuadro 2. Formación de grupos, dosis y tiempo de exposición para la inducción de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados en el cocodrilo de pantano.

Grupo	n	Dosis	Tiempo de exposición	Vía de administración
1 (Testigo negativo)	5	500 μ l de agua inyectable	Cada 24 h/ 2 días	v.o.
2	5	4 mg de CF/Kg	Cada 24 h/ 2 días	v.o.
3	5	7 mg de CF/Kg	Cada 24 h/ 2 días	v.o.
4	5	10 mg de CF/Kg	Cada 24 h/ 2 días	v.o.

Todas las dosis serán ajustadas a un volumen final de 500 μ l con agua inyectable. CF: ciclofosfamida; n: tamaño de la muestra; v.o.: vía oral.

o Preparación y análisis de las muestras

Con la gota de sangre se realizaron dos extendidos sobre portaobjetos limpios. Las muestras se dejaron secar y fueron fijadas en etanol absoluto por 10 min. La tinción se realizó con naranja de acridina ^{Zúñiga-González 2003}, tinción específica para ácidos nucleicos, lo que permite demostrar que lo que se observa al microscopio es ADN en eritrocitos micronucleados (EMN) o un eritrocito con prolongaciones nucleares (EPN), según sea el caso. Se debe tomar en consideración que el naranja de acridina es un compuesto que se intercala entre las bases del ADN y por lo tanto, fue necesario contar con medidas de seguridad tales como uso de guantes, bata y cubrebocas para evitar contacto y aspiración durante su manejo.

Las muestras fueron observadas con el objetivo 100× en un microscopio marca OLYMPUS modelo CX40, con sistema iluminador de epifluorescencia OLYMPUS modelo CX-RFLT50 (lámpara de mercurio 50W y filtro de fluorescencia azul DMB-2 OLYMPUS) y sistema fotográfico (35 mm, manual) OLYMPUS modelo SC3512Y. Se contó el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares (EPCPN) en 1,000 eritrocitos policromáticos (EPC; estos parámetros detectan el daño ocurrido durante las 24 a 48 horas después de la administración del genotóxico); asimismo se contó el número de EMN y EPN en 10,000 eritrocitos totales (ET), según sea el caso (esto permite detectar el daño acumulado después de la administración). La proporción de EPC en 1,000 ET fue obtenida también, para determinar si la dosis empleada fue citotóxica y pudiera causar mielodepresión (esto permite saber si aún hay división celular), lo que podría llevar a una conclusión equivocada y dar un falso negativo.

Con la tinción de naranja de acridina, los EPC se observan de color rojo o anaranjado y los ENC en verde oscuro, en ambos casos el ADN del núcleo y del MN se tiñe de color amarillo brillante (Figura 20). Los MN se contaron sólo cuando se encontraron totalmente separados del núcleo y presentaron forma redonda (Figura 20b y 20d), mientras las prolongaciones nucleares se consideraron cuando la prolongación estuvo totalmente originada a partir del núcleo, cuando se encontró parcialmente sobrepuesta al núcleo o cuando presentó forma de gota en la que se observara o presumiera que existiera una hebra unida al núcleo (Figura 20a y 20c).

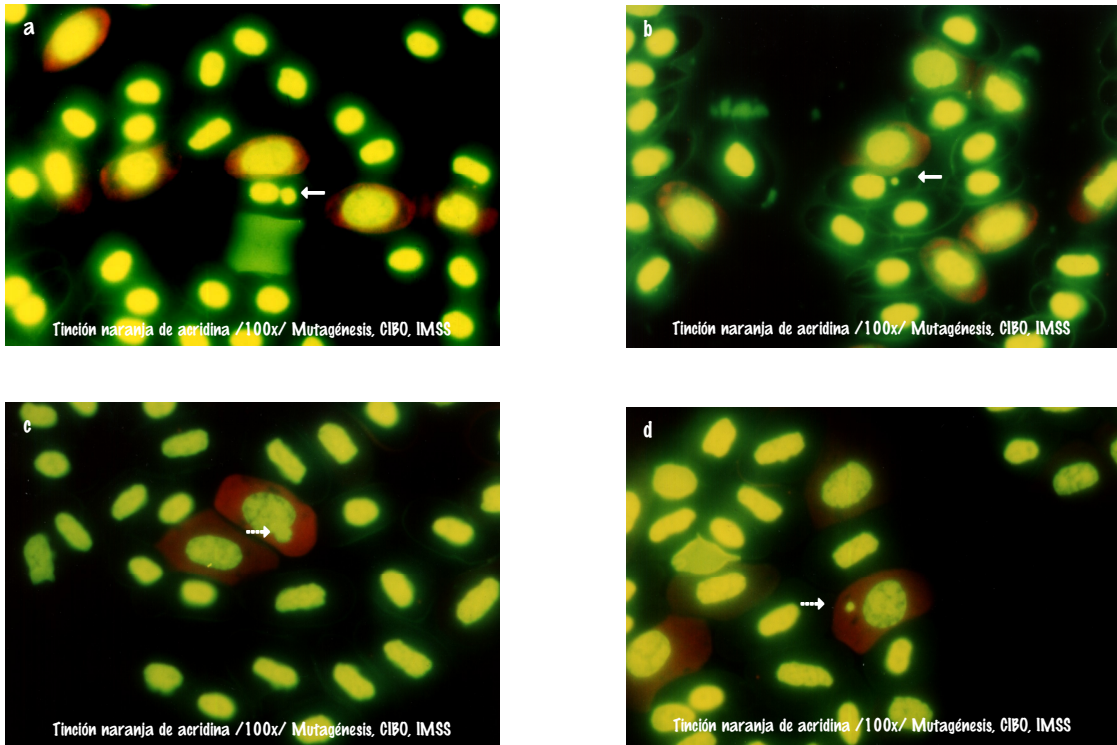


Figura 20. Muestras de eritrocitos nucleados de sangre periférica. a) Eritrocito con prolongación nuclear; b) Eritrocito micronucleado; c) Eritrocito policromático con prolongación nuclear; d) Eritrocito policromático micronucleado.

o **Análisis Estadístico**

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones se hicieron entre cada grupo y su respectivo valor basal (0 h), mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste LSD para múltiples comparaciones *post hoc*, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05. Las pruebas estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS (v.11.0) para Windows®.

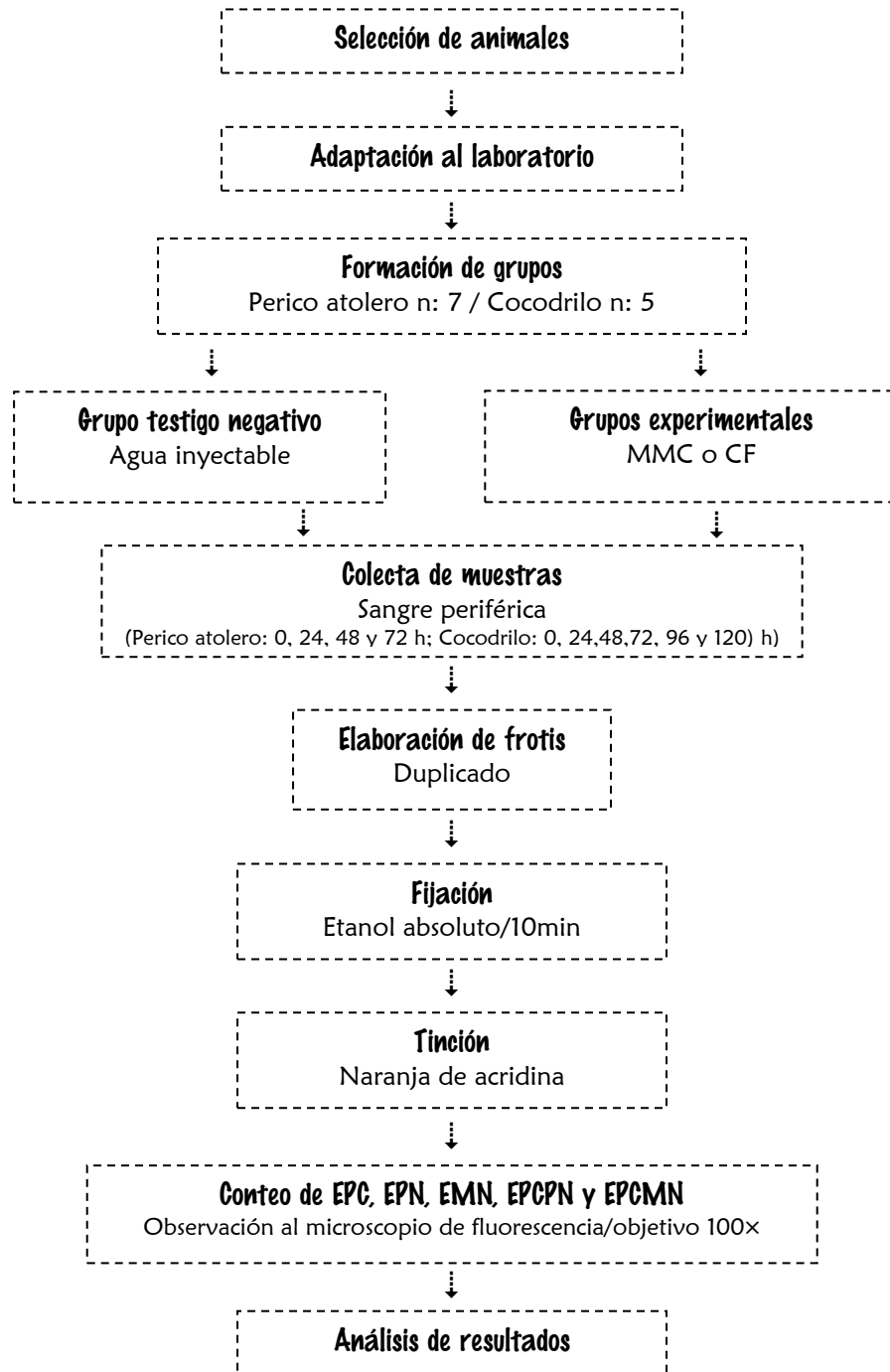
o **Consideraciones éticas**

Los organismos fueron tratados de acuerdo a los requerimientos y Normas Institucionales y Gubernamentales de México e Instituciones de Salud de los Estados Unidos de Norte América Diario Oficial 1999, Poole TB 1994,

o **Consideraciones legales**

Los organismos utilizados contaron con los permisos y requerimientos legales establecidos en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, así como en la Ley General de Vida Silvestre y en la Convención CITES. El destino final de los especímenes lo determinó la Dirección General de Vida Silvestre/SEMARNAT, entidad gubernamental encargada de expedir los permisos correspondientes (Anexo D).

Diagrama de flujo:



Resultados

o Inducción de EPN y EMN con MMC en el perico atolero

Se analizaron en total 784 laminillas de sangre periférica de perico atolero. El promedio del valor basal de EPN, EMN y EPC a partir de los 28 pericos atoleros utilizados en el estudio fue de 13.4 EPN/10,000 ET, 3.4 EMN/10,000 ET y 83.6 EPC/1,000 ET.

En el grupo testigo negativo (Grupo 1) no se observaron diferencias significativas en el número de EPN o EMN, mientras que la proporción de EPC varió a las 24 h ($P<0.004$) y 48 h ($P<0.04$). Este incremento significativo en la proporción de EPC también fue observado en el grupo 4 (Dosis alta: 4 mg de MMC/Kg) a las 24 h (Cuadros 3 y 4; gráficas 1 y 2).

El grupo 2 (Dosis baja: 2 mg de MMC/Kg) presentó diferencias significativas en la proporción de EPC a las 72 h ($P<0.004$). En los EPN y EMN no se observó incremento significativo durante el tiempo de muestreo, mientras que los EPCPN y los EPCMN incrementaron significativamente a las 24 h ($P<0.006$, $P<0.007$, respectivamente) 48 h ($P<0.01$, $P<0.02$, respectivamente) y 72 h ($P<0.03$, $P<0.01$, respectivamente) (Cuadros 3 y 4; gráficas 1 y 2).

En el grupo 3 (Dosis intermedia: 3 mg de MMC/Kg) no se observó diferencia en la frecuencia de EPN y EMN o en la proporción de EPC, durante el tiempo de muestreo, sin embargo, los EPCMN incrementaron significativamente a las 48 h ($P<0.03$) y 72 h ($P<0.04$), mientras que el número de EPN incrementó con respecto al valor basal, pero este aumento no fue significativo (Cuadros 3 y 4; gráficas 1 y 2).

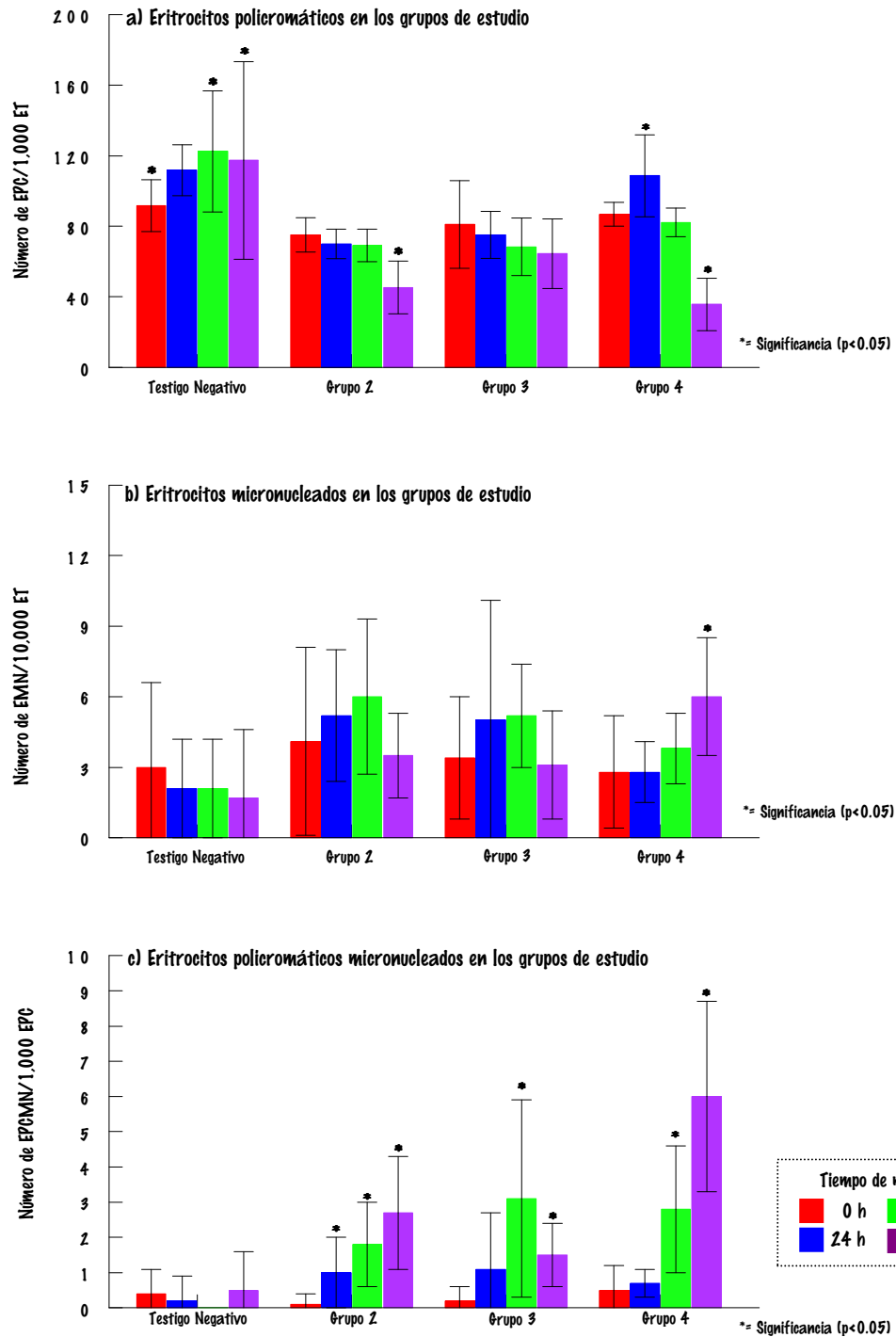
En el grupo 4 (Dosis alta: 4 mg de MMC/Kg) el número de EPCPN incrementó significativamente a las 48 h ($P<0.001$) y 72 h ($P<0.01$) y los EPCMN a las 48 h ($P<0.01$) y 72 h ($P<0.006$) (Cuadro 3 y 4; gráficas 1 y 2).

Cuadro 3. Efecto de la mitomicina-C en el número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el perico atolero.

Grupo	n	Eritrocitos	Tiempo de Muestreo			
			0 h	24 h	48 h	72 h
Testigo negativo (200 µl de agua inyectable)	7	EPC/1,000 ET	91.7±14.7	111.8±14.3	122.5±34.4	117.4±56.0
		Valor de P		<0.003	<0.04	NS
		EMN/10,000 ET	3.0±3.6	2.1±2.1	2.1±2.1	1.7±2.9
Valor de P			NS	NS	NS	
Valor de P		EPCMN/1,000 EPC	0.4±0.7	0.2±0.7	0±0	0.5±1.1
Valor de P				NS	NS	NS
2 (2 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	75.2±9.7	70.0±8.4	69.1±9.2	45.2±14.9
		Valor de P		NS	NS	<0.004
		EMN/10,000 ET	4.1±4.0	5.2±2.8	6.0±3.3	3.5±1.8
Valor de P			NS	NS	NS	
Valor de P		EPCMN/1,000 EPC	0.1±0.3	1.0±1.0	1.8±1.2	2.7±1.6
Valor de P				<0.007	<0.02	<0.01
3 (3 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	81.0±24.9	75.2±13.3	68.4±16.3	64.5±19.7
		Valor de P		NS	NS	NS
		EMN/10,000 ET	3.4±2.6	5.0±5.1	5.2±2.2	3.1±2.3
Valor de P			NS	NS	NS	
Valor de P		EPCMN/1,000 EPC	0.2±0.4	1.1±1.6	3.1±2.8	1.5±0.9
Valor de P				NS	<0.03	<0.04
4 (4 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	86.7±6.8	108.7±23.2	82.2±8.2	35.7±14.7
		Valor de P		<0.03	NS	<0.001
		EMN/10,000 ET	2.8±2.4	2.8±1.3	3.8±1.5	6.0±2.5
Valor de P			NS	NS	<0.03	
Valor de P		EPCMN/1,000 EPC	0.5±0.7	0.7±0.4	2.8±1.8	6.0±2.7
Valor de P				NS	<0.01	<0.006

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EMN: eritrocitos micronucleados; EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados; EPC: eritrocitos policromáticos; ET: eritrocitos totales; MMC: mitomicina-C; NS: no significativo; n: tamaño de la muestra. Las comparaciones se realizaron en cada grupo entre el valor basal (0 h) con los siguientes tiempos de muestreo (24, 48 y 72 h) para cada parámetro analizado (EMN, EPCMN y EPC), se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste LSD para múltiples comparaciones *post hoc*, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05. Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 200 µl con agua inyectable.

Gráfica 1. Distribución del número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el perico atolero.

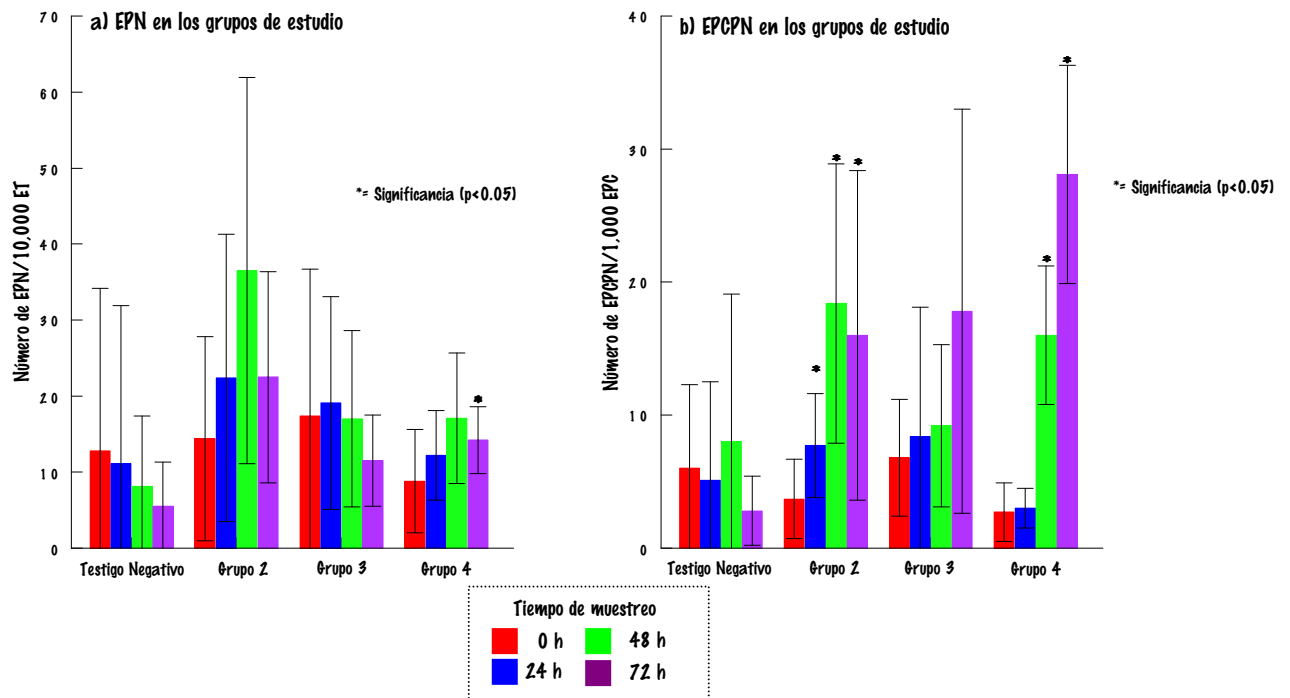


Cuadro 4. Efecto de la mitomicina-C en el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en el perico atolero.

Grupo	n	Eritrocitos	Tiempo de Muestreo			
			0 h	24 h	48 h	72 h
Testigo negativo (200 µl de agua inyectable)	7	EPC/1,000 ET	91.7±14.7	111.8±14.3	122.5±34.4	117.4±56.0
Valor de P				NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	12.8±21.4	11.1±20.8	8.1±9.3	5.5±5.8
Valor de P				NS	NS	NS
		EPCPN/1,000 EPC	6.0±6.3	5.1±7.4	8.0±11.1	2.8±2.6
Valor de P				NS	NS	NS
2 (2 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	75.2±9.7	70.0±8.4	69.1±9.2	45.2±14.9
Valor de P				NS	NS	<0.004
		EPN/10,000 ET	14.4±13.4	22.4±18.9	36.5±25.4	22.5±13.9
Valor de P				NS	NS	NS
		EPCPN/1,000 EPC	3.7±3.0	7.7±3.9	18.4±10.5	16.0±12.4
Valor de P				<0.006	<0.01	<0.03
3 (3 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	81.0±24.9	75.2±13.3	68.4±16.3	64.5±19.7
Valor de P				NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	17.4±19.3	19.1±14.0	17.0±11.6	11.5±6.0
Valor de P				NS	NS	NS
		EPCPN/1,000 EPC	6.8±4.4	8.4±9.7	9.2±6.1	17.8±15.2
Valor de P				NS	NS	NS
4 (4 mg de MMC/Kg)	7	EPC/1,000 ET	86.7±6.8	108.7±23.2	82.2±8.2	35.7±14.7
Valor de P				<0.03	NS	<0.001
		EPN/10,000 ET	8.8±6.8	12.2±5.9	17.1±8.6	14.2±4.4
Valor de P				NS	NS	<0.05
		EPCPN/1,000 EPC	2.7±2.2	3.0±1.5	16.0±5.2	28.1±8.2
Valor de P				NS	<0.001	<0.001

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EPN: eritrocitos con prolongaciones nucleares; EPCPN: eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares; EPC: eritrocitos policromáticos; ET: eritrocitos totales; MMC: mitomicina-C; NS: no significativo; n: tamaño de la muestra. Las comparaciones se realizaron en cada grupo entre el valor basal (0 h) con los siguientes tiempos de muestreo (24, 48 y 72 h) para cada parámetro analizado (EPN, EPCPN y EPC), se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste LSD para múltiples comparaciones *post hoc*, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05. Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 200 µl con agua inyectable.

Gráfica 2. Distribución del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en el perico atolero.



En cuanto a la sensibilidad de los parámetros evaluados en el perico atolero, el número de EPN fue mayor en todos los grupos de estudio, comparado con el número de EMN, y de igual forma fue el comportamiento de los EPCPN, comparado con el número de EPCMN (Gráficas 1 y 2).

o **Inducción de EPN y EMN con MMC en el cocodrilo de pantano**

Por tratarse de organismos poiquiloterms, los cuales son influenciados por la temperatura del ambiente, se implementó un sistema que permitió mantener la temperatura constante en su albergue durante el período de aclimatación. Para esto se diseñó y construyó un prototipo que permitió lograr este objetivo y la temperatura a la cual se decidió llevar a cabo la inducción con el genotóxico, así como del grupo testigo negativo fue a 30°C, ya

que es la temperatura promedio a la que se encuentra el agua en la Laguna de Alcuahue (Figura 21).



Figura 21. Albergue para cocodrilos con temperatura controlada. a) Albergue para cocodrilos; b) Interior del albergue para cocodrilos con temperatura controlada; c y d): Sistema de control de temperatura; e): Vista general del albergue para cocodrilos con temperatura controlada.

Este sistema permitió mantener la temperatura constante, independientemente de la temperatura del exterior o ambiente, para esto fue necesaria una cámara aislada

térmicamente, por lo que se usó un termo tipo hielera para formar una cámara de temperatura controlada, la temperatura se mantuvo constante dentro de esta cámara mediante un circuito cerrado, por donde circulaba y a su vez se filtraba el agua para mantener la calidad del agua aceptable en el albergue, tal que permitiera mantener por períodos prolongados el agua limpia, antes de ser cambiada para reducir el estrés por manipulación en acciones de limpieza del albergue.

El filtro consistía en una cámara de decantación en donde entraba el agua y las partículas más grandes y pesadas permanecían en el fondo del filtro, el agua pasaba por una porción inicial de fibra de material sintético, semejante a la usada en los filtros de acuario, para retirar las partículas suspendidas más gruesas, la capa intermedia consistía en arena fina que retiraba las partículas pequeñas, finalmente una capa de carbón activado para retirar sustancias disueltas en el agua. Estos tres elementos son inertes y sólo retiran elementos del agua sin adicionarle otros, de tal manera que el agua se mantuvo durante todo el proceso sin turbidez ni olores, evidenciando la aceptable calidad del agua.

La temperatura en este ciclo cerrado se mantenía mediante un equipo de baño maría que se mantenía en una cámara fría para evitar la influencia del exterior, el baño maría se programaba para mantener la temperatura seleccionada, a su vez la baja temperatura interior del habitáculo donde se alojaba el baño maría era proporcionada por agua fría en circuito cerrado enfriada por un enfriador de agua para garrafón de consumo humano marca General Electric, modificado para tal fin.

Dentro del habitáculo frío se hacía circular el agua fría por un serpentín de cobre, lo cual disipaba el frío en el interior de este habitáculo por dos pequeños ventiladores de 12V. El agua proveniente del filtro en la cámara de temperatura controlada en este circuito cerrado

era impulsada por una pequeña bomba para acuario, forzando su tránsito por el filtro y el baño maría para su retorno a la cámara térmica con los cocodrilos (Figura 22).

La temperatura era monitoreada constantemente con un termómetro clínico de mercurio por lo que se tuvo la certeza que durante toda la duración del experimento la temperatura se mantuvo a 30°C sin variación dentro del albergue de los cocodrilos, y de manera independiente de la temperatura ambiente del laboratorio, con lo cual se eliminó la variable que pudiera significar la variación de la temperatura ambiente en este tipo de animales poiquiloterms.

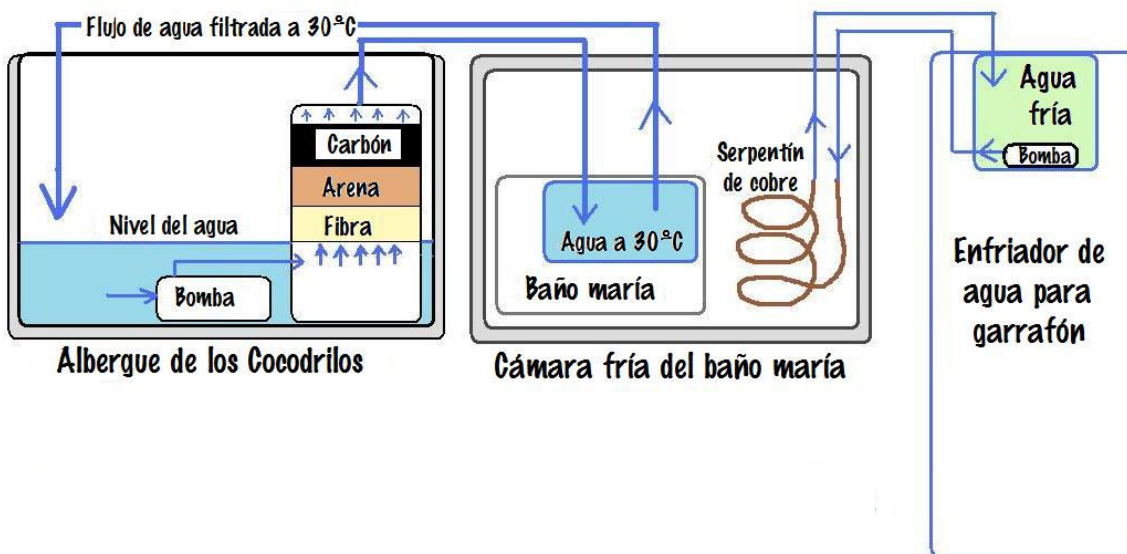


Figura 22. Diagrama del prototipo diseñado para albergar cocodrilos con temperatura controlada.

Se analizaron en total 600 laminillas de sangre periférica de cocodrilo de pantano. El promedio del valor basal de EPN, EMN y EPC a partir de los 20 organismos utilizados fue de 52.4 EPN/10,000 ET, 2.9 EMN/10,000 ET y 17.0 EPC/1,000 ET.

El grupo testigo negativo no mostró diferencias significativas (Cuadros 5 y 6) en el número de EPC, EMN, EPN y EPCPN (Gráfica 3 y 4).

En el grupo 2, que recibió 4mg de CF/Kg, no se observó incremento significativo en el número de EMN, EPCMN y EPCPN, aunque si se observó diferencia significativa en la frecuencia de EPN a las 24 h ($P<0.05$), 72 h ($P<0.04$) y 120 h ($P<0.03$) de muestreo (Cuadros 5 y 6; gráficas 3 y 4).

En el grupo 3, que recibió 7 mg de CF/Kg, el número de EPC no mostró incrementó significativo durante el tiempo de muestreo, pero si se observaron incrementos significativos en la frecuencia de EMN a las 48 h ($P<0.04$) y 72 h ($P<0.03$) de muestreo, EPN a las 120 h ($P<0.03$) de muestreo y EPCPN a las 48 h ($P<0.03$) y 72 h ($P<0.04$) de muestreo (Cuadro 5 y 6; gráficas 3 y 4).

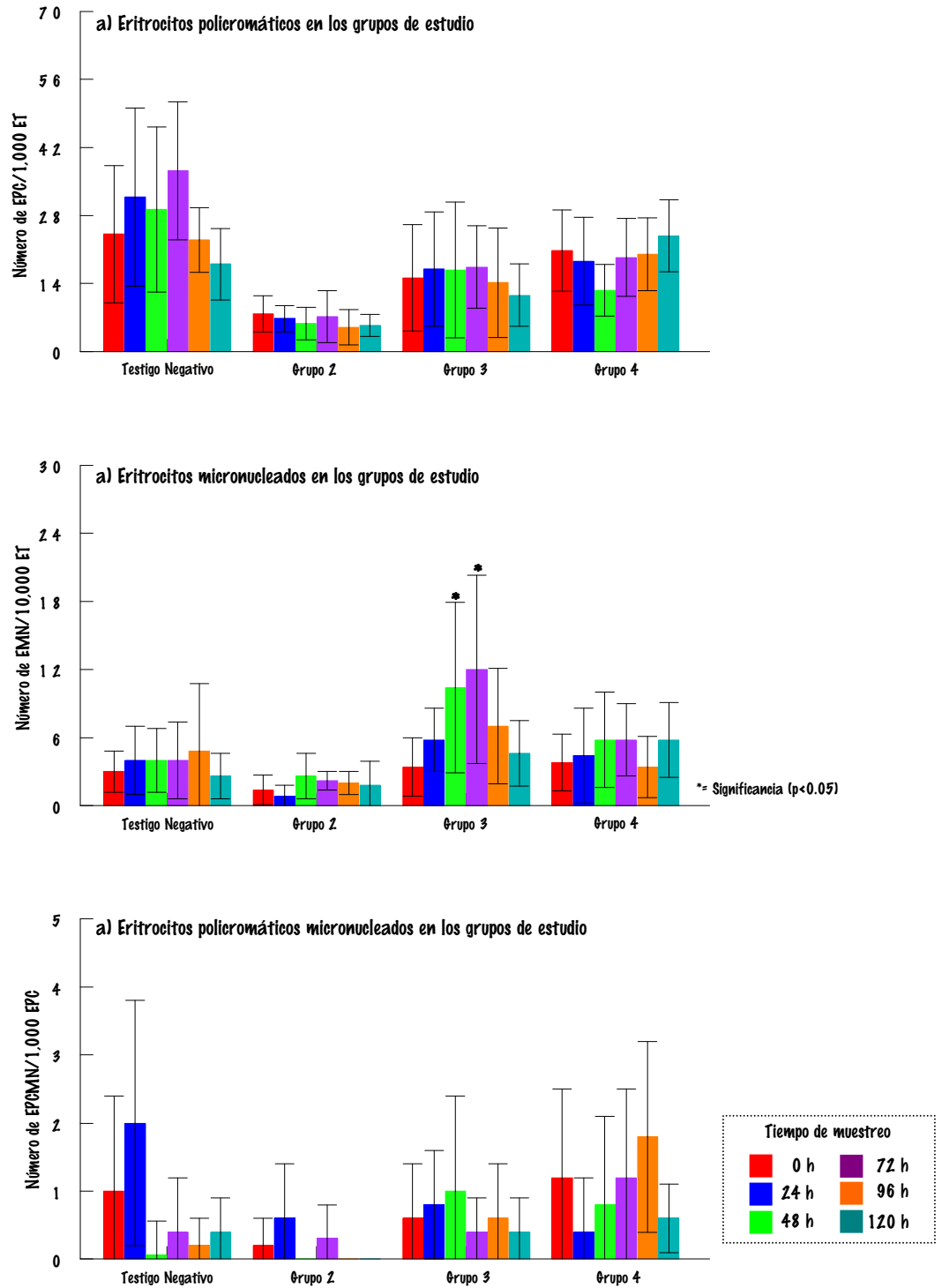
El grupo 4, que recibió 10 mg de CF/Kg, no mostró incremento significativo en el número de EPC, EMN y EPCMN, pero si incrementó significativamente la frecuencia de EPN (24 h, $P<0.01$; 48 h, $P<0.001$; 72 h, $P<0.01$ y 96 h, $P<0.03$) y EPCPN (72 h, $P<0.05$ y 96 h, $P<0.01$) (Cuadros 5 y 6; gráficas 3 y 4).

Cuadro 5. Efecto de la ciclofosfamida en el número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el cocodrilo de pantano.

Grupo	n	Eritrocitos	Tiempo de Muestreo					
			0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Testigo negativo (500 µl de agua inyectable)	5	EPC/1,000 ET	24.2±14.1	31.8±18.3	29.2±17.0	37.2±14.2	23.0±6.67	18.0±7.34
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EMN/10,000 ET	3.0±1.8	4.0±3.0	4.0±2.8	4.0±3.39	4.8±5.93	2.6±2.0
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPCMN/1,000 EPC	1.0±1.4	2.0±1.8	.06±0.5	0.4±0.8	0.2±0.4	0.4±0.5
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
2								
(4 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	7.8±3.7	6.8±2.7	5.8±3.3	7.2±5.3	5.0±3.6	5.4±2.3
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EMN/10,000 ET	1.4±1.3	0.8±1.0	2.6±2.0	2.2±0.8	2.0±1.0	1.8±2.1
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPCMN/1,000 EPC	0.2±0.4	0.6±0.8	0.0±0.0	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
3								
(7 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	15.2±10.9	17.0±11.8	16.8±14.0	17.4±8.5	14.2±11.23	11.60±6.42
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EMN/10,000 ET	3.4±2.6	5.8±2.8	10.4±7.5	12.0±8.3	7.0±5.1	4.6±2.9
Valor de P				NS	<0.04	<0.03	NS	NS
		EPCMN/1,000 EPC	0.6±0.8	0.8±0.8	1.0±1.4	0.4±0.5	0.6±0.8	0.4±0.5
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
4								
(10 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	20.8±8.34	18.6±9.0	12.6±5.3	19.4±8.0	20.0±7.5	23.8±7.4
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EMN/10,000 ET	3.8±2.5	4.4±4.2	5.8±4.2	5.8±3.2	3.4±2.7	5.8±3.3
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPCMN/1,000 EPC	1.2±1.3	0.4±0.8	0.8±1.3	1.2±1.3	1.8±1.4	0.6±0.5
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EMN: eritrocitos micronucleados; EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados; EPC: eritrocitos policromáticos; ET: eritrocitos totales; CF: ciclofosfamida; NS: no significativo; n: tamaño de la muestra. Las comparaciones se realizaron en cada grupo entre el valor basal (0 h) con los siguientes tiempos de muestreo (24, 48, 72, 96 y 120 h) para cada parámetro analizado (EPC, EMN y EPCMN), se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste LSD para múltiples comparaciones *post hoc*, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05. Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 500 µl con agua inyectable.

Gráfica 3. Distribución del número de eritrocitos policromáticos, eritrocitos micronucleados y eritrocitos policromáticos micronucleados en el cocodrilo de pantano.

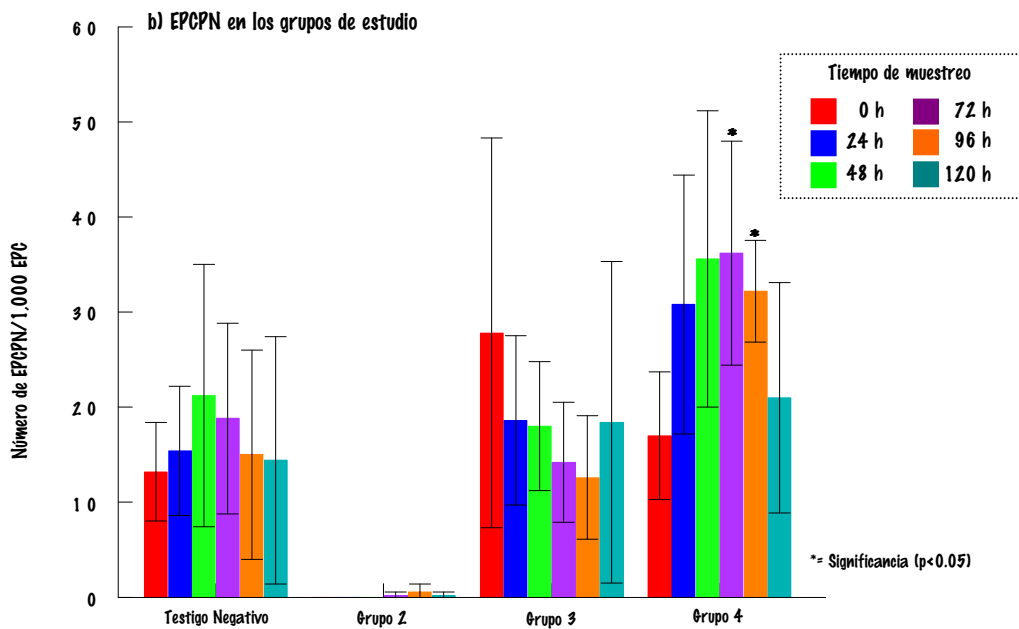
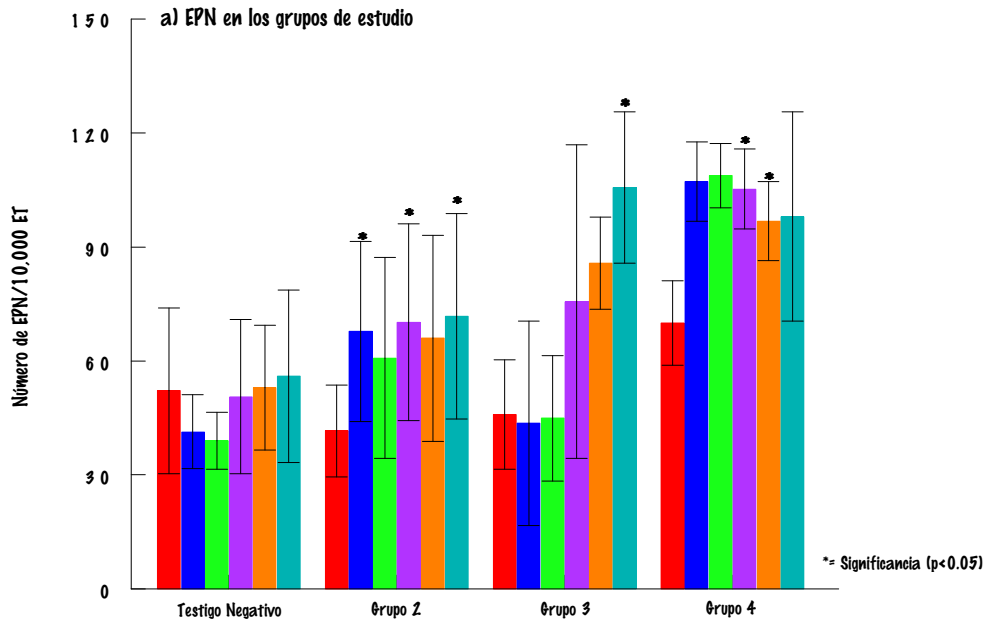


Cuadro 6. Efecto de la ciclofosfamida en el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en el cocodrilo de pantano.

Grupo	n	Eritrocitos	Tiempo de Muestreo					
			0h	24h	48h	72h	96h	120h
Testigo negativo (500 µl de agua inyectable)	5	EPC/1,000 ET	24.2±14.1	31.8±18.3	29.2±17.0	37.2±14.2	23.0±6.67	18.0±7.34
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	52.2±21.8	41.4±9.7	39.0±7.5	50.6±20.3	53.0±16.4	56.0±22.7
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPCPN/1,000 EPC	13.2±5.2	15.4±6.8	21.2±13.8	18.8±10.0	15.0±11.0	14.4±13.0
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
<hr/>								
2								
(4 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	7.8±3.7	6.8±2.7	5.8±3.3	7.2±5.3	5.0±3.6	5.4±2.3
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	41.6±12.1	67.8±23.7	60.8±26.4	70.2±25.9	66.0±27.1	71.8±27.0
Valor de P				0.05	NS	0.04	NS	0.03
		EPCPN/1,000 EPC	0±0	0±0	0±0	0.2±0.4	0.6±0.8	0.2±0.4
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
<hr/>								
3								
(7 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	15.2±10.9	17.0±11.8	16.8±14.0	17.4±8.5	14.2±11.23	11.60±6.42
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	46.0±14.4	43.6±26.9	45.0±16.5	75.6±41.2	85.8±12.1	105.6±19.9
Valor de P				NS	NS	NS	NS	<0.03
		EPCPN/1,000 EPC	27.8±20.5	18.6±8.9	18.0±6.8	14.2±6.3	12.6±6.5	18.4±16.9
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
<hr/>								
4								
(10 mg de CF/Kg)	5	EPC/1,000 ET	20.8±8.34	18.6±9.0	12.6±5.3	19.4±8.0	20.0±7.5	23.8±7.4
Valor de P				NS	NS	NS	NS	NS
		EPN/10,000 ET	70.0±11.1	107.2±10.4	108.8±8.5	105.2±10.5	96.8±10.4	98.0±27.5
Valor de P				<0.01	<0.001	<0.01	<0.03	NS
		EPCPN/1,000 EPC	17.0±6.7	30.8±13.6	35.6±15.6	36.2±11.8	32.2±5.35	21.0±12.1
Valor de P				NS	NS	<0.05	<0.01	NS

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EPN: eritrocitos con prolongaciones nucleares; EPCPN: eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares; EPC: eritrocitos policromáticos; ET: eritrocitos totales; CF: ciclofosfamida; NS: no significativo; n: tamaño de la muestra. Las comparaciones se realizaron en cada grupo entre el valor basal (0 h) con los siguientes tiempos de muestreo (24, 48, 72, 96 y 120 h) para cada parámetro analizado (EPN y EPCPN), se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste LSD para múltiples comparaciones *post hoc*, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05. Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 500 µl con agua inyectable.

Gráfica 4. Distribución del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos policromáticos con prolongaciones nucleares en el cocodrilo de pantano.



En cuanto a la sensibilidad de respuesta de los parámetros evaluados en el cocodrilo de pantano, respecto la detección del daño a corto plazo los EPCPN respondieron mejor comparado con los EPCMN, ya que los EPCPN incrementaron significativamente a diferencia de los EPCMN (Gráficas 3 y 4). El incremento significativo de los EPN para detectar el daño genotóxico a largo plazo fue más efectivo que los EMN, ya que se observó incremento significativo a diferencia de los EMN (Grafica 3 y 4).

Por otro lado, al analizar los frotis de sangre de cocodrilo, se observaron eritrocitos en mitosis (Figura 23), evento poco común en cordados.

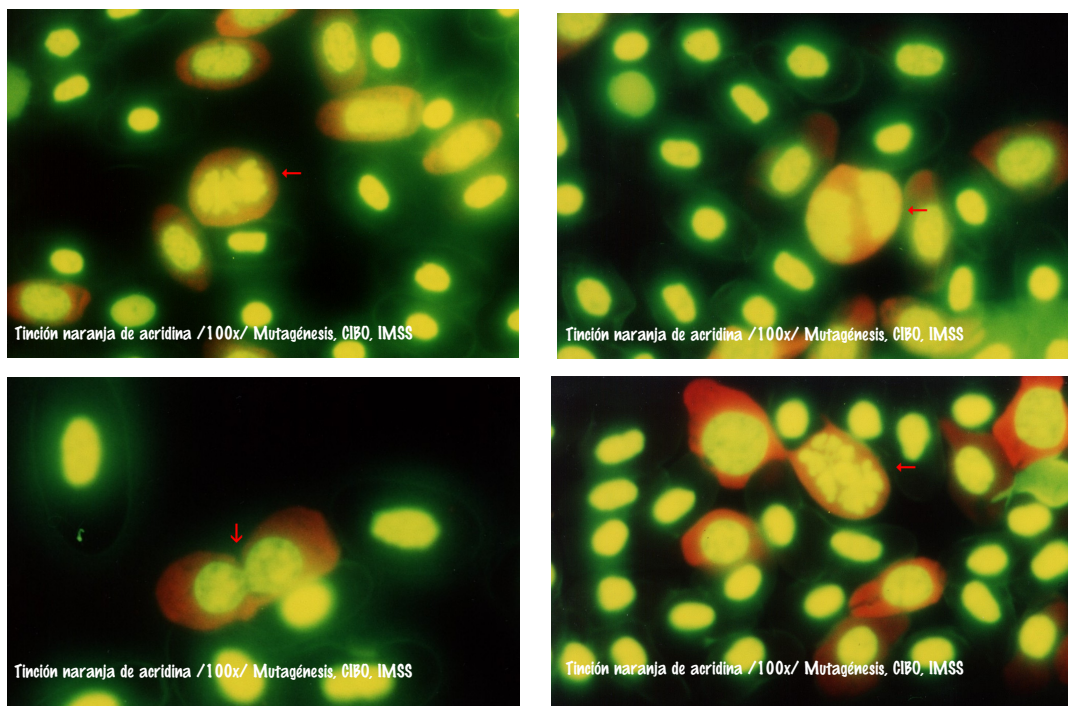


Figura 23. Eritrocitos de cocodrilo en mitosis.

Discusión

Para realizar monitoreos de agentes genotóxicos mediante el conteo del incremento de MN y/o PN dentro de una población o entre diferentes poblaciones, se requiere conocer primero si la especie a utilizar presenta MN y/o PN en cantidad suficiente y seguido de esto, establecer los conteos basales de esta especie (valores espontáneos), para entonces poder efectuar comparaciones con poblaciones expuestas en su ambiente a contaminantes de tipo genotóxico.

La contaminación del medio ambiente es un problema grave y creciente que afecta a todas las actividades humanas, por ejemplo el medio ambiente acuático es el destino final de muchos de los contaminantes producidos por fuentes naturales y antropogénicas ^{Fleeger 2003}. Entre los contaminantes, aquellos de origen químico, con potencial genotóxico y cancerígeno, que se han identificado en el medio ambiente constituyen una amenaza para la vida acuática y por ende, para la vida terrestre ^{De la Flora de 1991}.

El ensayo de MN fue desarrollado originalmente en mamíferos, pero se ha adaptado con éxito para su uso en organismos no mamíferos, como en eritrocitos de peces ^{Zavala-Aguirre 2007}, larvas de anfibios ^{Campana 2003} y muda de salamandra ^{Zamora-Pérez 2004}. Recientemente, las PN han sido descritas como posibles bioindicadores de agentes genotóxicos ^{García-Serrano 2001; Montero 2003} en cultivo de linfocitos humanos y de cerdo, en los que el número de PN se incrementó con la administración de MMC, por lo que se propuso que las PN podrían ser utilizadas como un marcador para evaluar exposiciones a genotóxicos ^{García-Serrano 2001}, sin embargo, este tipo de estructuras no se había descrito en especies con eritrocitos nucleados, así como acuáticas, y la presencia de PN podría servir como una medida complementaria para evaluar genotoxicidad *in vivo* e *in situ* con este tipo de especies con eritrocitos nucleados.

En el presente trabajo se contaron los EPN, EMN, EPCPN y EPCMN para observar si estos cuatro parámetros incrementaban *in vivo* después de administrar MMC al perico atolero o CF al cocodrilo de pantano.

Factores como el estado general de salud y nutricional, sexo, edad y la contaminación del medio ambiente, son variables importantes que influyen en el daño cromosómico y proliferación celular, tanto en humanos como en animales ^{Fenech 1998; Gauthier 19996}. En el presente trabajo todos los organismos utilizados presentaban buen estado de salud al momento de participar en el experimento.

◦ **Inducción de EPN y EMN con MMC en el perico atolero**

EL grupo testigo negativo, no presentó diferencias significativas en el número de EPN o EMN, lo que permite concluir que el estrés de la manipulación no influyó en ninguno de estos parámetros. En este grupo, la proporción de EPC varió a las 24 h ($P < 0.004$) y 48 h ($P < 0.04$), ya que el número de EPC incrementó en el tiempo de muestreo, esta variación a diferencia de la observada al incrementar la dosis de la MMC, pudiera estar más bien relacionada con un proceso de compensación de la médula ósea por la sangre que se toma para realizar la muestra. Este incremento significativo en la proporción de EPC también fue observada en el grupo 4 (Dosis alta; 4 mg de MMC/Kg) a las 24 h de muestreo. Sin embargo, esto de ninguna manera altera el proceso de la inducción en los grupos experimentales, en los cuales la clara disminución de EPC sí se relacionó con el efecto depresor del inductor sobre la médula ósea (Cuadros 3 y 4).

Los incrementos observados de los parámetros evaluados en el perico atolero sugieren mayor sensibilidad de la valoración por medio de EPN que de EMN, ya que el número de EPN siempre fue mayor que el de EMN en cada tiempo (Cuadros 3 y 4; gráficas 1 y 2), lo

que sugiere que las PN podrían ser más sensibles para detectar mayor rango de daño al ADN que los MN. Sin embargo, esta apreciación podría no ser correcta, ya que las grandes desviaciones estándar obtenidas en el presente pudieran ser las causantes de no observar significancia en algunos de los tiempos en que se contaron MN, así como el no tener organismos de condiciones similares como lo fue el sexo, edad y posiblemente el origen, dado que los animales no fueron obtenidos de un bioterio, y si bien, se procuró trabajar con animales de peso similar, esto no necesariamente implica que tengan edad similar, ya que se ha observado que este parámetro puede influir en la capacidad para retirar a los MN de la circulación ^{Zúñiga-González 2001a}. Otro dato importante es que en estos pericos fue común encontrar parásitos intra-eritrocitarios en mayor o menor cantidad, parásitos que se pueden observar en otras especies de aves domésticas como las palomas y que puede ser fauna que no represente un problema al ave, pero se conoce de parásitos, como el caso de infecciones por *Taenia solium cysticerci*, que inducen aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y mutaciones, esto atribuido a moléculas secretadas por el parásito, las cuales desencadenan una serie de eventos que podrían también provocar que la cantidad de EPN y EMN varíe ^{Serrano-García 2001}, por lo que es probable que los parásitos en estos pericos pudieran desencadenar una serie de eventos que puedan ser responsables de la variabilidad en el número de EPN y EMN observados en el presente trabajo.

o **Inducción de EPN y EMN con CF en el cocodrilo de pantano**

Los resultados obtenidos en esta especie demuestran, por las observaciones hechas en el grupo testigo negativo, que la variable de manipulación, la temperatura, así como la alimentación no induce la formación de EPN y/o EMN, ya que este grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas.

En el cocodrilo, se pudo inducir la formación de PN así como de MN, efecto observado en los eritrocitos nucleados de sangre periférica al ser expuestos a tres diferentes dosis de CF cada 24 h durante dos días. En el caso de los EMN se observaron incrementos de estas estructuras en los tres grupos expuestos a una de las tres dosis de CF comparado con el valor basal y estos incrementos fueron significativos en el grupo que recibió la dosis de 7 mg de CF/Kg. De igual forma, el número de PN incrementó en los grupos expuestos a CF y estos fueron significativos en el grupo que recibió la dosis alta del genotóxico. El hecho de que el incremento de PN y/o MN alcanzara diferencia estadística (MN en el grupo de dosis media y las PN en el grupo de alta de CF), muy probablemente se debió a que los resultados no presentaron grandes desviaciones estándares, por lo que los incrementos observados en los grupos expuestos alcanzó significancia. Otro factor pudo ser, como fue el caso de los experimentos con pericos, que los animales no fueron obtenidos de un bioterio, ya que la edad, el sexo, el estado nutricional, así como el peso son variables que pueden influir en el número de MN ^{Zúñiga-González 2001a}. En este experimento los grupos de cocodrilos fueron conformados con organismos de peso y talla similar, así como del mismo tiempo y lugar de colecta, por lo que se estuvo trabajando con cocodrilos de edades similares y aunque se determinó el sexo de los organismos por medio del método visual o perceptivo (Figura 24), los grupos se formaron independientemente del sexo, ya que la literatura menciona que este método presenta alto margen de error ^{Sigler 1995}, comparado por ejemplo con la determinación del sexo por hormonas esteroides en heces fecales, que es uno de los métodos más certeros para determinar el sexo en estos organismos ^{Sigler 1995}.

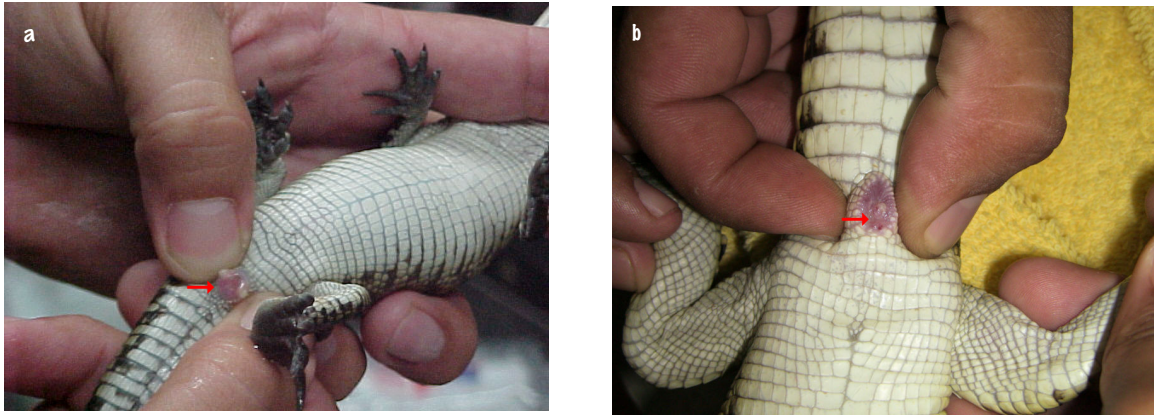


Figura 24. Sexado visual de crías de cocodrilo de pantano: a) hembra; b) macho.

En el ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica, el obtener la proporción de EPC circulantes permite determinar si la dosis empleada es citotóxica y produce mielodepresión (esto permite saber si aún hay división celular), lo que podría llevar a una conclusión equivocada y dar un resultado falso negativo. Con respecto a lo anterior, en trabajos previos del Laboratorio de Mutagénesis (IMSS), se ha observado disminución de los EPC por acción de los genotóxicos, que debido a las concentraciones empleadas o a la susceptibilidad de la especie, pueden incluso provocar que los valores de EPC disminuyan hasta niveles cercanos a cero, con la consecuente baja en el número de EMN por la citotoxicidad provocada ^{Zúñiga-González 2001b; Zúñiga-González 2003a}. Sin embargo, en el caso del grupo de cocodrilos que recibió la dosis baja de CF (4 mg de CF/Kg), la disminución en la proporción de EPC fue muy importante, comparado con los otros grupos que recibieron el genotóxico, tanto así que el número de EPC con MN y PN se vieron afectados, ya que disminuyeron hasta valores de cero. En este caso se descartó el efecto citotóxico de la CF, ya que en los grupos que recibieron dosis más altas la proporción de EPC no se vio afectada. Los organismos que conformaron este grupo fueron colectados en el mismo lugar y tiempo de muestreo y una vez que llegaron al laboratorio estos fueron puestos en cuarentena, tiempo

en el cual los organismos se adaptan a las condiciones de laboratorio y se les da la oportunidad de que se pueda eliminar cualquier efecto al cual se haya expuesto en su medio ambiente natural, con el objetivo de que los organismos que participen en el estudio presenten las mismas o muy similares condiciones. En este sentido, uno de los parámetros más importantes de la adaptabilidad de los organismos a condiciones diferentes a su medio es la alimentación y ésta fue realizada con neonato de rata y ratón proporcionados por el bioterio del CIBO (IMSS), dieta que fue adecuada para los organismos. Por lo que una vez que los organismos pasaban este tiempo de adaptación y que se observaba que se alimentaban adecuadamente, entonces participaban en el estudio. La disminución tan drástica en la proporción de EPC en este grupo pudiera haber sido debido a que este tiempo de adaptación no fue suficiente para que la médula ósea de estos organismos, particularmente para este grupo, se recuperara de alguna posible exposición previa a un agente ya sea físico, químico o biológico en su medio ambiente o simplemente al estrés por el cambio de hábitat. Entonces, en el presente trabajo se propone que el monitoreo de los valores de EPC en los cocodrilos será útil para evaluar el estado fisiológico de los cocodrilos y detectar precozmente si el organismo está en condiciones óptimas para iniciar el experimento, ya que no hay que olvidar que el ensayo de MN requiere que el tejido en el que se observa el efecto se divida. Por lo tanto, más que el tiempo de cuarentena, el tener valores de EPC estables daría la pauta para iniciar los experimentos.

Otra variable a considerar en esta tesis es la temperatura, los cocodrilos son organismos poiquiloterms, llamados también exotérmicos o “de sangre fría”, esto es que no pueden regular significativamente su temperatura corporal generando calor y esta varía según la temperatura de su entorno ^{Álvarez del Toro 1974}, debido a esto, en el presente trabajo se diseñó y desarrolló un sistema para albergar a los cocodrilos que permitió mantener la temperatura

constante dentro del albergue de los organismos en experimentación. La temperatura es un factor medio ambiental importante, ya que ejerce efectos, por ejemplo, en la conducta alimenticia y el proceso digestivo de los reptiles y sobre el ADN de las células de los organismos ^{Asanami 2001}. En relación al efecto sobre la conducta alimenticia, la mayoría de los cocodrilos deja de alimentarse cuando la temperatura cae por debajo de 25°C, por lo que se considera que la temperatura óptima para la alimentación está situada entre 25 y 35°C. Con respecto al efecto sobre el material genético, se sabe que exponerse a altas temperaturas incrementa el daño al ADN, ya que esta macromolécula se desnaturaliza a los 70°C ^{Chernoff 1997}. Por ejemplo, en ratones expuestos a temperaturas superiores a los 39.5°C, se observó incremento de MN en médula ósea ^{Asanami 1997}. Uno de los mecanismos de acción propuestos por el cual el incremento de la temperatura afecta al ADN es que rompe las fibras del huso mitótico ^{Asanami 1997}, por lo que se clasifica como un agente aneuploidogénico. Por lo que en el presente trabajo la temperatura a la cual se mantuvieron los cocodrilos en su albergue durante el tiempo del experimento fue de 30°C, para asegurarnos que esta variable no fuera a afectar los resultados, aunado a que es la temperatura promedio del sitio de colecta de los organismos.

La concentración de eritrocitos en sangre periférica es menor en los reptiles que en las aves, ello se debe principalmente a las demandas de oxígeno que requiere el ave para realizar el vuelo, así como a la relación inversa existente entre el tamaño y el número de glóbulos rojos ^{Campbell 1996}. No obstante, la similitud entre los eritrocitos de reptiles y aves es notoria, corroborando la hipótesis de un ancestro común ^{Villar 2003}. Con respecto a la observación en los frotis de sangre de cocodrilo de eritrocitos inmaduros, una explicación es que los hematíes de los reptiles se producen en la médula ósea o, bajo ciertas condiciones, en el bazo e hígado, culminando muchas veces su maduración en la sangre circulante. Ello

permite encontrar eritrocitos inmaduros circulantes, tales como rubrocitos, eritrocitos policromáticos o células en mitosis, especialmente en cocodrilos jóvenes ^{Oliveira-Monteiro 2004}.

Por otro lado, tanto en el perico atolero como en el cocodrilo, el número de EPN fue mayor comparado con el número de EMN (Figura 25).

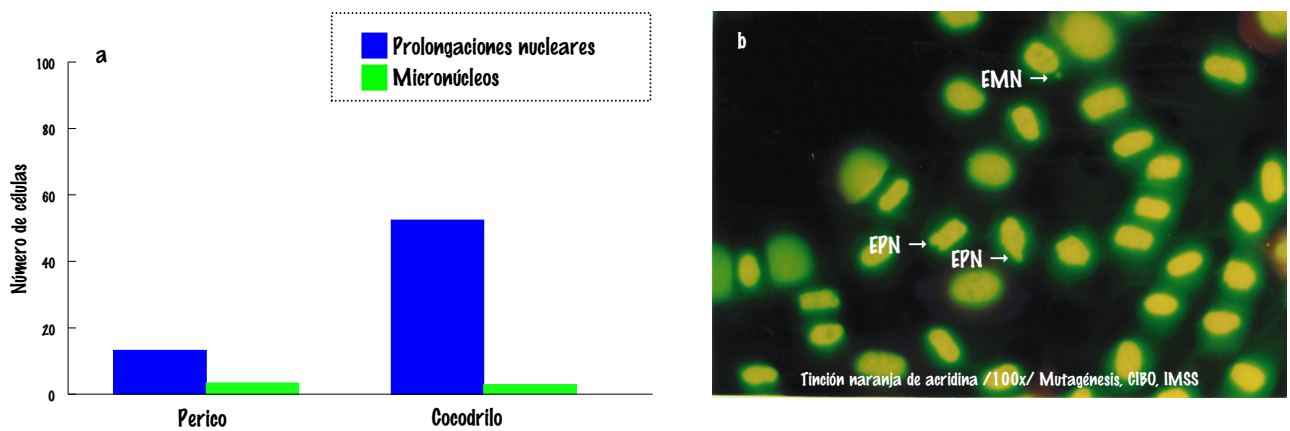


Figura 25. Comparación del número de eritrocitos con prolongaciones nucleares y eritrocitos micronucleados. a) Gráfica que ejemplifica que en ambas especies el número de eritrocitos con prolongaciones nucleares fue mayor al número de eritrocitos micronucleados; b) Muestra de sangre periférica de cocodrilo donde en un campo de lectura del microscopio se observa mayor número de eritrocitos con prolongaciones nucleares que con micronúcleos.

Contrario a lo que se menciona en la literatura respecto a que los MN son más frecuentes que las PN, en este caso las PN se presentaron en mayor número que los MN. Esto podría explicarse tomando en cuenta el mecanismo de formación de las PN y de los MN, ya que se ha descrito que probablemente las PN den origen a los MN ^{Lindber 2007}. También podría deberse a que los MN cuentan con el control del bazo para retirarlos de la circulación, debido a que estos se encuentran en el citoplasma sin ninguna asociación con el núcleo, por lo que este sistema de limpieza, a cargo principalmente del bazo, reconoce a un eritrocito con MN como una célula anormal, por lo que una vez que pase por el bazo este es identificado como anormal y es destruido ^{Schalm and Schalm 1964; Hillman 1987; Hillman 1990}. Esto no sucede con las PN, ya que estas estructuras guardan una unión con el núcleo principal, lo que los

identifica como parte de mismo, por lo que no son reconocidas como cuerpos extraños embebidos en el citoplasma, como es el caso de los MN.

En el Laboratorio de Mutagénesis (IMSS) se han muestreado a más de 150 especies animales, con el objetivo de encontrar organismos que de manera natural e *in vivo* puedan ser utilizados como bioindicadores de agentes que afecten al ADN, ya sea en su propio hábitat o en el laboratorio. En el caso de las especies con eritrocitos nucleados, estas se estaban quedando rezagadas para este fin, ya que hasta el momento de las especies que se habían muestreado dentro del orden de los anfibios, reptiles y aves, sólo 3 de ellas presentaban MN espontáneos, más sin embargo presentan PN espontáneas en buen número (Figura 26).

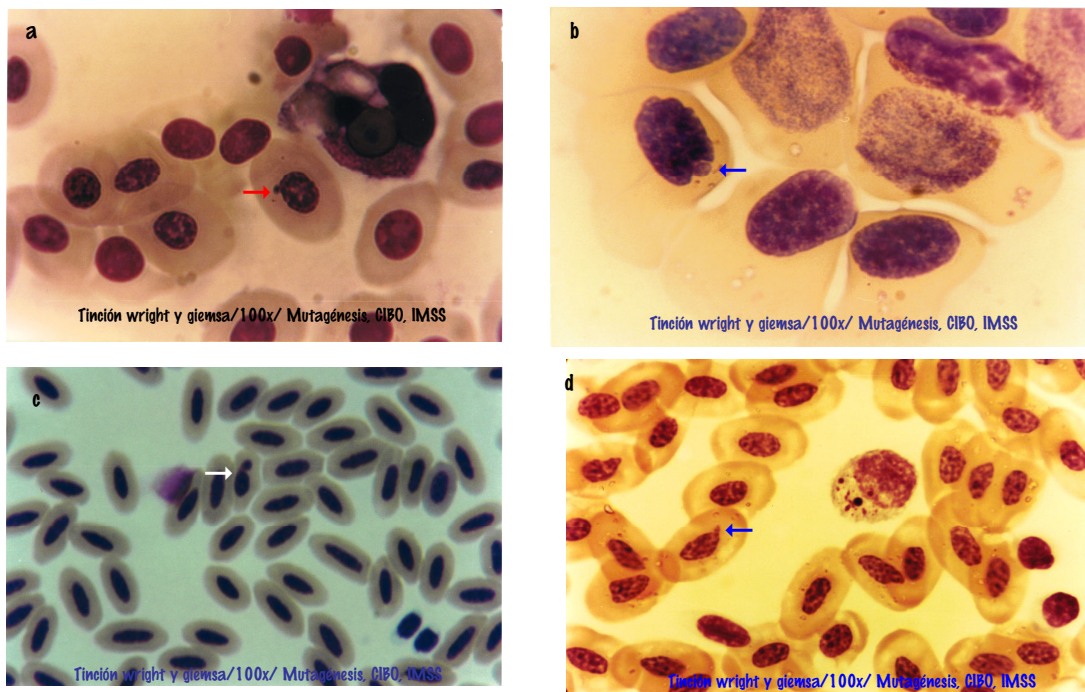


Figura 26. Muestras de eritrocitos nucleados con prolongaciones nucleares de diferentes especies. a) Sapo (*Bufo horribilis*); b) Salamandra (*Salamandra sp.*); c) Tortuga lagarto (*Chelydra serpentina*); d) Serpiente de cascabel (*Crotalus basiliscus*)

Por lo que las especies con eritrocitos nucleados no estarían descartadas para ser utilizadas como centinelas naturales de agentes genotóxicos mediante el incremento de PN y en aquellas especies, como es el caso del perico atolero y del cocodrilo de pantano se contarían tanto el incremento de MN como de PN, con lo cual se tendrían dos parámetros a considerar para determinar la posible exposición a un agente genotóxico.

Si consideramos que dentro de los cordados sólo los mamíferos, que son los únicos que presentan eritrocitos anucleados, representan el 15% de las especies que habitan en la tierra, mientras que las clases de aves, mamíferos, reptiles y anfibios, son especies con eritrocitos nucleados y representan el 85% de las especies existentes ^{Bisby 2008}. Estos hallazgos se vuelven muy importantes, por lo que el implementar el conteo de PN como indicador de genotoxicidad en especies con eritrocitos nucleados, daría la oportunidad de contar con mayor número de organismos que tendrían el potencial de servir como centinelas, ya que las consecuencias de exponerse a elementos genotóxicos presentes en los hábitats naturales que afectan o modifican el ADN, son algunas de las causas que ponen en peligro la sobrevivencia de la vida en nuestro planeta y atentan contra la riqueza genética del país.

El ensayo de MN y PN es una prueba rápida, sencilla y económica y los resultados que se obtienen a partir de ellas no dejan lugar a duda del daño producido, ya que a mayor número de MN o PN, entonces mayor es el daño al material genético. Otras de las ventajas que presentan estos ensayos realizados *in vivo* en eritrocitos de sangre periférica, es que sólo se requiere una gota de sangre para realizar los frotis. En el presente trabajo, en ambas especies la obtención de la muestra se realizó por medio del corte de la garra y se pudo obtener la cantidad necesaria de sangre para realizar los frotis. Esto facilita aun más la realización de este tipo de ensayos, ya que la obtención de la muestra de sangre no es

invasiva para el organismo y no es necesario sacrificar al animal para obtener la muestra, por lo que una vez que se estableció la presencia e incremento tanto de PN y MN en el perico atolero y en el cocodrilo de pantano, al realizar monitoreos posteriores, por ejemplo en su hábitat natural, sólo sería necesario capturar al organismo, tomar la muestra y posteriormente liberarlo.

En el presente trabajo se demostró que la MMC y la CF fueron capaces de inducir incremento de EPN, EMN, EPCPN y EPCMN, parámetros utilizados para evaluar el daño a largo y corto plazo en los eritrocitos nucleados del perico atolero y del cocodrilo de pantano. Incrementos similares en el número de PN han sido previamente descritos en cultivos celulares ^{Serrano-García L 2001}.

Como resultado del presente se concluye que las PN pueden ser una herramienta útil y complementaria para monitorear genotoxicidad cuando se trabaja con especies que presentan eritrocitos nucleados, como es el caso de los peces, anfibios, reptiles y aves, con la ventaja de que sólo se requiere una gota de sangre para realizar el análisis, además de que es rápida, sencilla, económica y los resultados que se obtienen a través de la realización de esta prueba son contundentes, ya que lo que indican las PN, así como los MN, se traduce en el ámbito celular como pérdida de material genético, esto es, información genética que no se integró al núcleo de las células hijas. Esto significa pérdida de ADN, información fundamental para la sobrevivencia de la vida de las especies.

Conclusiones

En el presente trabajo se concluye:

- Los valores basales de EPN, EMN y EPC en el perico atolero fueron 13.4 EPN/10,000 ET, 3.4 EMN/10,000 ET y 83.6 EPC/1,000 ET y en el cocodrilo de pantano fueron 52.4 EPN/10,000 ET, 2.9 EMN/10,000 ET y 17.0 EPC/1,000 ET.
- Tanto la MMC como la CF incrementaron el número de EPN y EMN en el perico atolero y en el cocodrilo de pantano, con respecto al valor basal en cada uno de los grupos expuestos a una de las tres dosis del genotóxico.
- El número de EPN fue mayor que el de EMN y tanto en el perico atolero como en el cocodrilo de pantano, ambos parámetros incrementaron significativamente después de la exposición a MMC o CF, ambos genotóxicos conocidos y utilizados como controles positivos en pruebas de genotoxicidad.
- El uso de las PN es una alternativa rápida, sencilla, económica, que para estudios de determinación de genotoxicidad sólo se requiere de una gota de sangre, con resultados contundentes en cuanto al daño producido y de gran utilidad en las especies que presenten eritrocitos nucleados, como alternativa cuando no sea posible establecer el número de MN espontáneos (que es como pueden ser útiles para llevar a cabo la prueba de MN) o pueden ser complementarias en estudios en los que es factible realizar también la prueba de MN.
- La valoración de las PN en eritrocitos nucleados amplía la posibilidad de los estudios de genotoxicidad, por el hecho de que existen muchas más especies de animales con esta característica.

Perspectivas

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se pretende:

- Aportar una nueva herramienta a fin de ser utilizada para el monitoreo ambiental de los ecosistemas donde tengan distribución los organismos utilizados, para determinar la presencia de agentes genotóxicos en el ambiente.
- Continuar con investigaciones para la aplicación de esta técnica en otros organismos con eritrocitos nucleados, distintos a los aquí utilizados, si consideramos que de cuatro clases de cordados (reptiles, mamíferos, anfibios y aves) las especies con eritrocitos nucleados representan más del 80%, por lo que el universo para investigación se presenta muy amplio.
- Que una vez probada la técnica en otros organismos con eritrocitos nucleados, podrá ser utilizada para el monitoreo ambiental en prácticamente cualquier ecosistema con distribución de especies de estas características.
- Dar una nueva opción para estudios de genotoxicidad en laboratorio, al utilizar a los organismos probados en el presente trabajo y otros con eritrocitos nucleados, una vez probados.
- Se diseñó y construyó un prototipo de cámara para control de temperatura que puede ser útil para otros estudios que requieran control de la temperatura ambiente, lo cual además es una aportación tecnológica original y accesible generada a partir del presente trabajo.

Bibliografía

- Alaoui-Jamali MA, Rossignol G, Schuller HM, Castonguay A. Transplacental genotoxicity of a tobacco-specific N-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, in Syrian golden hamster. *Mutat Res.* 1989;223:65-72.
- Allen JW, Collins BW, Setzer RW. Spermatid micronucleus analysis of ageing effects in haster. *Mutat Res.* 1996; 316:261-266.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995; 343:121-135.
- Álvarez del Toro M. Los Crocodylia de México (Estudio Comparativo). Ed. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, México D.F. 1974. p. 70.
- Ames BN. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacterial for detection. En: *Microbial test for mutagenicity/carcinogenicity*. Ed. Traul KA. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1985a;12:69-73.
- Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: *Microbial Test for Mutagenicity/Carcinogenicity*. Ed. Traul KA. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1985b;12:113-128.
- Asanami S, Shimono K. High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat Res.* 1997;390:79-83.
- Beaula KD and Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res.* 1991; 263: 185-196.
- Bhunya SP, Jena GB. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an *in vivo* study in chicken. *Mutat Res.* 1992; 272:175-181
- Bisby FA, Roskov YR, Orrell TM, Nicolson D, Paglinawan LE, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, van Hertum J, eds (2008). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2008 Annual Checklist*. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2008/. Species 2000: Reading, U.K.
- Bloom SE, Nanna VC, Dietert RR. Teratogenicity of chemical mutagens to differentiating, B-lymphocytes *in vivo*: Detection by direct DNA labelling and sister chromatid exchange induction. *Environ Mol Mutagen.* 1987;9:3-18.
- Burgeot T, His E, Galgani F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res.* 1995; 342:125-140.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ and Dulout FN. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genet Mol Biol.* 2003; 26:99-103.
- Campbell TW.. *Clinical Pathology*. In: *Reptile Medicine and Surgery* (Mader DR Ed.), Saunders, Philadelphia, 1996, p. 248-257.

- Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus 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.
- Casas-Andreu G y Aguilar-Miguel X. CONABIO Fichas especies NOM-059-SEMARNAT-2001;2008.
- Choy WN, Willhite CC, Cukierski MJ, Book SA. Primate Micronucleus study of L-Selenomethionine. *Environ Mol Mutagen.* 1989; 14:123-125.
- Corazza G, Ginaldi L, Zoli G, Frisoni M, Lalli G, Gasbarrini G, Quaglino D. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function, a ressesment. *Clin Lab Haematol.* 1990; 12:269-275.
- Córdoba D. Toxicología. 4ª ed. Manual Moderno. Bogotá, Colombia. 2001. p.18-19.
- De Flora S, Bagnasco M, Zancacchi P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean sea. *Mutat Res.* 1991; 258:285-320.
- Diario Oficial. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Elston RN, Stenkvis B. Quantitative estimation of nuclear buds and micronuclei in bovine cells transformed by Rous sarcoma and SV 40 viruses. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1965;68:543-9.
- Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.* 2002;504:131-136.
- Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:23-36.
- Gauthier JM, Dubeau H, Rassart E. Induction of micronuclei *in vitro* by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts. *Mutat Res.* 1999; 439:87-95.
- Gibson GG and Skett P. Pathways of Drug Metabolism. En: *Introduction to Drug Metabolism.* 2ª ed. Blackie Academic & Profesional An Imprint of Chapman & Hall. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 1994. p.1-34.
- Gómez-Meda BC, Zúñiga-González GM, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Mendoza BM. Folate supplementation of cyclophosphamide-treated mothers diminishes micronucleated erythrocytes in peripheral blood of newborn rats. *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44: en prensa
- Grant WF, Lee HG, Logan DM, Salamone MF. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat Res.* 1992; 270:53-64.
- 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.

- Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, R.R. Russo A, Sutou S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:234-252.
- Hayashi M, Morita T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 120:241-247.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronuclei assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990; 245:245-249
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991; 18:277-291.
- Heddle JA, Hite M, Kirthart BK, Mavournin JT, MacGregor G, Newell W, Salamaone 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.
- 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.
- Helma C, Kronberg L, Ma TH, Knasmuller S. Genotoxic effects of the chlorinated hydroxifuranones 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and 3,4-dichloro-5-hydroxy-2(5H)-furanone in tradescantia micronucleus assay. *Mutat Res.* 1995; 346:181-186.
- Herrera A, Barrueco C, Caballo C, Peña E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 20:218-228.
- Hillman RS and Finch CA. El eritrocito. 5a ed. Manual Moderno. México. 1987. p.18-23.
- Hillman RS, Finch CA, Boggs DR, Winkelstein A, Harper LA. Manual de Hematología. 1a ed. 8a reimp. Manual Moderno. México. 1990.
- [http:// www.gbif.net](http://www.gbif.net), 2008-11-25
- <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/280/atolero.html>
- 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.
- 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.
- Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 4ª ed. Manual Moderno. México, D.F. 1991. p.453.

- 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.
- Lähdetie J. Micronuclei induced during meiosis by ethylmethanosulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res.* 1983; 120:257-260.
- Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* 2007; 617:33-45.
- Loa-Loza E. Concentración de diclorodifeniltricloroetano (DDT) en poblaciones silvestres de cocodrilo (*Crocodylus acutus* y *C. moreletii*) en la zona costera de México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de posgraduados, Montecillos, Estado de Mexico, 2007.
- Lowe X, Collins B, Allen J, Titenko-Holand N, Breneman J, van Beek M, Bishop J, Wyrobeck AJ. Aneuploidies and micronuclei in the germ cells of male mice of advanced age. *Mutat Res.* 1995; 338:59-76.
- Luck E. Conservación química de los alimentos. Ed. Acribia. España. 1977;243
- Ma TH, Xu Z, Xu Ch, McConell H, Valtierra E, Arreola G, Zhang H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res.* 1995; 334:185-195.
- Madrigal-Bujaidar E, Cassani-Galindo M. Efecto mutagénico de la mitomicina C en cultivos de linfocitos humanos. *Rev Bioquímica* 1996;21: 538-544.
- McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de Hematología. Ed. Médica Panamericana. 5ª ed. Madrid. 1998; 8,18.
- McVan BF. Índice de Medicamentos. Manual Moderno. México, D.F., 1995; 1049.
- Meyne J and Legator MS. Sex-related differences in cytogenetic effects of benzene in the bone marrow of Swiss mice. *Environ Mutagen.* 1980; 2:43-50.
- 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.
- Montero R, Serrano L, Dávila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, Abad I, Valencia L, Sierra P, Camacho R. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen.* 2003;42:216-222.
- Montoya-Cabrera MA. *Toxicología Clínica.* Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 1992. p315.
- Nagae Y, Miyamoto H, Suzuki Y, Shimizu H. Effect of estrogen on induction of micronuclei by mutagens in male mice. *Mutat Res.* 1991; 263:21-26.

- Odagiri Y and Uchida H. Influence of serum micronutrients on the incidence of kinetochore-positive or –negative micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res.* 1998; 415:35-45.
- Oliveira Monteiro A. *Patología Clínica de Répteis.* 2004. On line: www.abma.com.br/2004/notes/216.pdf.
- Ortiz R, Medina H, Rodriguez L, Gonzalez-Marquez H, Cortes E. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43:179-85.
- Pariza MW. *Mutagens and carcinogens in the diet.* Wiley-Liss. New York, USA. 1990. p.1-9, 139.
- Peace BE and Succop P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutat Res.* 1999; 425:225-230.
- Pearson HA, Johnston D, Smith KA, Touloukian RJ. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. *N England J Med.* 1978; 298:1389-1392.
- Plewa MJ, Gentile JM. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En Hollander A. *Serías Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection.* Plenum Press. New York. 1982; vol. VII:401-420.
- Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat Res.* 2008;650:202-9.
- Poole TB and Robinson R. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.* England: Longman Scientific & Technical. 1994; 309,415.
- Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutat Res.* 1985;147:65-78.
- Quirós L, Ruiz X, Sanpera C, Jover L, Piña B. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environ Pollut.* 2008;155:81-7.
- Ramírez-Muñoz MP, Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Portilla E, García-Martínez D, Ramos A, Cantú JM, Sánchez-Corona J. Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Lab Anim Sci.* 1999;49:418-420.
- Reagan WJ, Sanders TG, De Nicola DB. *Hematología Veterinaria-Atlas de especies domésticas.* Ed. Harcourt Brace. Madrid. 1999; 5-7,13.
- Rodríguez-Ariza A, Abril N, Navas JI, Dorado G, López-Barea J, Pueyo C. Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve mollusks from Spanish coasts. *Environ Mol Mutagen.* 1992;19:112-124.
- Rodríguez-Arnaiz R. *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Capítulo III.* Fondo de cultura económica, México, D.F., 1995.

- Rodríguez-Carranza R. Vademécum Académico de Medicamentos. 3ª. Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 2000; 644-645.
- Rudek Z, Rozek M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* y *Xenopus laevis* by the pyretroid Fastac 10 EC. Mutat Res. 1992; 298:25-29.
- Ruiz EF, Rabago V, Lecona ME, Perez SU, Ma TH. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and *in situ* monitoring. Mutat Res. 1992; 270:45-51.
- Russo A and 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.
- Schalm OW. Hematología Veterinaria. Ed. UTEHA. 1ª ed. México. 1964; 216-234.
- Schlegel R, MacGregor JT, Everson RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. Cancer Res. 1986; 46:3717-3721.
- Schmezer P, Pool BL, Lefevre PA, Callander R, 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.
- Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res. 1975;31:9-15.
- SEMARNAP. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural. 1997-2000 México. 1997, SEMARNAP-INE, 17-24, 80.
- Serrano-García L and Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. Environ Mol Mutagen. 2001;38:38-45.
- Shelby MD, Erexson GL, Hook GJ, Tice RR. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. Environ Mol Mutagen. 1993;21:160-179.
- Smith C and Reynard A. Farmacología. Médica Panamericana. México, D.F. 1998.
- Tanaka T, Shimizu N. Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. J Cell Sci. 2000; 113: 697-707.
- Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. Environ Mol Mutagen. 1987; 9:37-58.
- Torres-Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. Mutat Res. 1998; 413:277-281.
- Torres-Bugarín O, Zamora Perez AL, Esparza-Flores A, López-Guido B, Feria-Velasco A, Cantú JM, Zúñiga G. Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. Bol Med Hosp Infant Mex. 1999; 56:212-217.
- Torres-Bugarín O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, Gutiérrez-Franco, Zúñiga-González G. Evaluation of cisplatin + 5-FU,

- carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res.* 2004; 565:91-101.
- Trzos RJ, Petzold GL, Brunden MN, Swenberg JA. The evolution of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutat Res.* 1978; 58:79-86.
 - Venitt S. Short-term assays using bacteria. En Montesano R, et al. (eds.). Long-term and short-term assays for carcinogens. A critical appraisal. IARC Scientific Publications. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1986;83:143-161.
 - Villar LJ, Puigbó P, Riera CM. Analysis of highly phosphorylated inositols in avian and crocodilian erythrocytes. *Comp Biochem Physiol.* 2003; 135: 169-175.
 - Waldmann P, Pivcevic B, Muller WEG, Zahn RK, Kurelec B. Increased genotoxicity of acetaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutat Res.* 1995; 342:113-123.
 - Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Hematology. 4th ed. USA: McGraw Hill. México. 1990. p.308.
 - Wojda A and Witt M. Manifestations of ageing at the cytogenetic level. *J Appl Genet* 2003; 44:383-399.
 - Yamamoto KI and Kikuchi YA. Comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* 1980; 71:127-131.
 - Zamora-Perez A, Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Bugarín O. Induction of micronucleated cells in the shed skin of salamanders (*Ambystoma sp.*) treated with colchicine or cyclophosphamide. *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44: en prensa.
 - Zamora-Perez A, Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J. El conteo de células micronucleadas en la muda del *Ambystoma* como nueva alternativa para la detección de genotóxicos. *Nowet* 2004; en prensa.
 - 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 species. *Mutat Res.* 1996a; 369:123-127.
 - Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Delgado-Lamas JL, De Loza-Saldaña R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res.* 1996b; 361:107-112.
 - 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-arabinoside. *Mutat Res.* 1998; 43:187-189.

- Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Gallegos-Arreola MP. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutat Res.* 2000; 467:99-103.
- Zúñiga-González G. Sistemas de detección de daño genético. En: *Genética, Ambiente y Salud de Álvarez Moya C.* 2ª ed. Universidad de Guadalajara. México. 2001. p.127-150.
- Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Álvarez-Moya C, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Gallegos-Arreola MP. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen.* 2001a; 37:173-177.
- Zúñiga-González G. Sistemas de detección de daño genético. En: *Genética, Ambiente y Salud de Álvarez Moya C.* 2ª ed. Universidad de Guadalajara. México. 2001b. p.127-150.
- Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res.* 2001c; 494:161-167.
- Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Rodríguez-Ávila JL. Especies exóticas con micronúcleos espontáneos: alternativa para estudios de genotoxicidad. *Nowet* 2002; 1:5-9.
- Zúñiga-González GM, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Gallegos-Arreola MP, Flores-García A, López-Urbe A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-Fluorouracil. *Arch Med Res.* 2003a; 34:141-144.
- Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Álvarez-Moya C, Torres-Bugarín O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environ Mol Mutagen.* 2003b; 42:306-310.
- Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Lemus-Varela ML, Rodríguez-Ávila JL, Gallegos-Arreola MP. Micronucleated erythrocyte frequencies in old and new world primates: measurement of micronucleated erythrocyte frequencies in peripheral blood of *Callithrix jacchus* as a model for evaluating genotoxicity in primates. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 46(4):253–259.
- Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Pérez AL, Muñoz-Magallanes T, Ramos-Valdez C, Gallegos-Arreola MP. Micronuclei in diabetes: Folate

supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007; 634:126–134.

Glosario

- **ADN.** DNA, ácido desoxirribonucleico. Doble cadena de nucleótidos enlazados (que contienen como azúcar desoxirribosa); materia fundamental de la que están compuestos los genes.
- **Agente alquilante.** Sustancia química con capacidad para producir radicales alquilo (por ejemplo, grupos metilo o etilo) en otra molécula; muchos agentes mutágenos actúan mediante alquilaciones.
- **Agente intercalante.** Compuesto químico que puede introducirse entre las bases empaquetadas en el interior de la doble hélice de ADN, provocando así probablemente una mutación de cambio de fase (inserción o deleción de uno o pocos pares de bases).
- **Alquilación.** Sustitución de un átomo activo de hidrógeno por un radical alquilo en un compuesto orgánico.
- **Anafase.** Tercera etapa de la mitosis o de la meiosis (I o II) durante la cual los cromosomas emigran hacia los polos opuestos de la célula.
- **Aneuploidogénico.** 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.
- **Antineoplásica.** Inhibe o impide la evolución de neoplasia; que restringe la maduración y la proliferación de células .
- **ARN.** RNA, ácido ribonucleico. Ácido nucleico de cadena sencilla similar al ADN pero que contiene el azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo en lugar de timina como una de las bases nitrogenadas.
- **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.
- **Cancerígeno.** 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 cromátides. 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.
- **Clastogénico.** 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 localizan en el núcleo de la célula y pueden

observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular.

- **Exógeno.** Que se desarrolla o se origina fuera del organismo.
- **Genotóxico.** Agente que afecta al ADN.
- **Micronúcleo (MN).** Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo, por lo que permanece quedando en el citoplasma celular.
- **Micronucleogénico.** Agente formador de micronúcleos.
- **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.
- **Mutágeno.** Cualquier agente que produce mutación.
- **Prolongación nuclear (PN).** Núcleo con lobulaciones en el núcleo
- **Quimioterapia.** Tratamiento de las enfermedades por agentes químicos.
- **Telofase.** Período de la división celular donde los cromosomas de las células hijas alcanzan los polos de la célula.
- **Teratógeno.** Agente o factor que produce defectos físicos en el embrión en desarrollo. Cualquier agente que interfiere con el desarrollo normal. Agente que produce anomalías congénitas o aumenta la frecuencia de una anomalía en la población.
- **Xenobiótico.** Sustancias químicas extrañas, incluidas las fabricadas por el hombre o los productos naturales; se incluyen fármacos, sustancias industriales, plaguicidas, contaminantes, productos de pirólisis de alimentos cocinados, alcaloides, metabolitos secundarios de plantas y toxinas producidas por mohos, plantas y animales. Muchos xenobióticos deben someterse a biotransformación para ejercer su efecto tóxico o cancerígeno característico.

Apéndice: Preparación y análisis de muestras

o Procedimiento general para la preparación de las muestras de eritrocitos de sangre periférica para la valoración de MN

1. Las muestras se colectan y registran.
2. En portaobjetos codificados, limpios y desengrasados, se elaboran dos frotis de sangre por cada muestra.
3. Se dejan secar a temperatura ambiente y se fijan en etanol absoluto por 10 min.
4. Se tiñen con anaranjado de acridina.
5. Se observan al microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x.
6. Se cuentan 10,000 eritrocitos por muestra y se consideran los siguientes parámetros:
 - EPN y EMN/10,000 ET (ENC y EPC), para determinar daño acumulado.
 - EPCPN y EPCMN/1,000 EPC, para determinar daño a corto plazo.
 - EPC/1,000 ET, para determinar citotoxicidad y como control interno del sistema.

o Tinción con anaranjado de acridina

La tinción de las laminillas se realizó con anaranjado de acridina (No. CAS 10127-02-3; SIGMA), colorante específico para ácidos nucleicos. El anaranjado de acridina emite fluorescencia y dado que el núcleo y los MN están formados de ADN, ésta propiedad es aprovechada para la visualización de MN, los cuales, al igual que el núcleo de la célula, aparecen de color amarillo o verde brillante, mientras que el ARN se tiñe de rojo o naranja cuando son observados con microscopia de fluorescencia (OLYMPUS CX31/CX40), mientras que el citoplasma se tiñe de verde opaco semitransparente.

El equipo de microscopia empleado para el análisis de las muestras fue de la marca OLYMPUS modelo CX40, con sistema iluminador de fluorescencia OLYMPUS modelo CX-

RFLT50 (lámpara de mercurio 50W y filtro de fluorescencia azul DMB-2 OLYMPUS) y sistema fotográfico (35 mm, manual) OLYMPUS modelo SC3512Y.

Se debe tomar en consideración que el anaranjado de acridina es un compuesto que se intercala entre las bases del ADN y por lo tanto, es necesario contar con medidas de seguridad tales como uso de guantes, bata y cubrebocas para evitar contacto y aspiración durante su manejo.

o **Procedimiento** ^{Zuniga-Gonzalez 2003b,}

1. Se prepara un buffer de fosfatos, para lo cual se pesan 2.16 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (No. 3828-01, JT BAKER) y 11.49 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (No. 3818-01, JT BAKER). Estas cantidades se disuelven en 1,000 ml de agua desmineralizada (pH final a 7.4).
2. Se recomienda separar en una jeringa de 10 ml aproximadamente 5 ml de buffer para emplearlo posteriormente en la lectura de laminillas.
3. En dos cajas de tinción con capacidad para 50 laminillas se vacían 500 ml en cada una.
4. En oscuridad, en una de las cajas se agregan 0.02 g de anaranjado de acridina y se disuelven mezclando con abatelenguas.
5. Posteriormente, se sumerge una gradilla con las laminillas a teñir en el anaranjado de acridina y se deja ahí por 10 min., se mueve de vez en cuando para que el colorante llegue a todas las laminillas.
6. Una vez transcurrido el tiempo, se saca la gradilla y se elimina el exceso de líquido al sacudir suavemente la gradilla sobre papel absorbente para posteriormente colocarla por 10 min. en la caja que contiene únicamente el buffer, con la finalidad de lavar excesos de colorante.

7. Pasado este tiempo se saca la gradilla, se sacude para eliminar excesos, se pasan las laminillas a una caja con tapa y se dejan secar en la estufa a 45°C con la tapa abierta, en oscuridad.
8. Una vez secas las laminillas, se tapa bien la caja y se guardan en oscuridad hasta su lectura.

Se recomienda leer las laminillas en un plazo no mayor a 5 semanas posterior a la tinción ya que la fluorescencia se pierde con el tiempo.

o **Lectura de las laminillas:**

Para la lectura de las laminillas, se toma una de la caja tapada, se le agregan una gotas del buffer que se separó en una jeringa, se cubre la laminilla con un cubreobjetos, se eliminan excesos de buffer con presión suave por ambos lados con una gasa y se coloca la laminilla en la platina del microscopio, para su lectura con lámpara de fluorescencia mediante observación con el objetivo 100x, para contar los EPN y EMN en 10,000 ET.

Las características tomadas en cuenta para considerar a una célula como normal fueron que presentara citoplasma intacto y relativamente homogéneo, poco o ningún empalme con células adyacentes; mientras que en el caso de los EMN se tomó en cuenta que tuvieran las características de la célula normal, además de que el MN tuviera una forma redonda o almendrada, con un tamaño menor a un quinto del eritrocito, que presentaran un perímetro liso y redondo que sugiriera membrana, así como intensidad de tinción, textura y plano focal similar al del núcleo de un leucocito. Mientras las prolongaciones nucleares se considerarán cuando la prolongación esté totalmente originada a partir del núcleo, cuando se encuentre parcialmente sobrepuesta al núcleo o cuando presente forma de gota en la que se observe o presuma que exista una hebra unida al núcleo.

Anexo A: Número de registro del proyecto.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE
Sierra Mojada No. 800, Col. Independencia, CP 44340
Guadalajara, Jal. México

COMITE DE INVESTIGACIÓN 1305

De acuerdo a las evaluaciones de los Subcomités de Investigación, Etica y Bioseguridad, el proyecto de investigación: **"ERITROCITOS CON PROLONGACIONES NUCLEARES: NUEVA ALTERNATIVA PARA DETECTAR GENOTÓXICOS"** del **Dr. en C. Guillermo M. Zúñiga González** en calidad de investigador responsable, se establece el siguiente

DICTAMEN

APROBADO para la ejecución del proyecto con la especie *Crocodyrilus moreletti* con número 1305-2006-04*

*El desarrollo del proyecto con las especies *Crocodyrilus acutus*, *Aratinga canicularis* y *Egretta ibula* se aprobarán de acuerdo a los permisos de la SEMARNAT.

Guadalajara, Jal., 17 de Marzo del 2006

PRESIDENTE

Dr. en C. José Sánchez Corona

SECRETARIO

Dr. en C. J. Fernando Rivas Solís

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Tel. (31) 618-94-10

Fax. (31) 618-17-56

Anexo B: Permiso de colecta para el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*).



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO No. SGPA/DGVS/ 11943
Hoja 1 de 2.-

México, D.F., a 12 NOV. 2004

**JAIME LUNA AGUIRRE,
CENTRO PARA LA CONSERVACIÓN E
INVESTIGACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE
"GUADALAJARA"
Presente.-**

En atención a la solicitud presentada por el M. en C. Antonio Estrada Valencia, Subdelegado de Gestión para la Protección Ambiental y Recursos Naturales, Encargado del Despacho de la Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Colima, mediante oficio No. SGPARN.-523/04 del 18 de marzo del presente año, y considerando que diversos informes señalan la presencia de abundantes ejemplares de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*), especie exótica para la Laguna de Alcu zahue, Municipio de Tecomán, Colima, que pueden por su parte agravar la problemática señalada por la delegación federal, con fundamento en los artículos 32-bis fracciones I, II, III, V, XXXIX y XLI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 5 fracciones I, II y III, 79 fracciones I, II, III y VI y 80 fracción I de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 1, 2, 3 fracciones XIII y XVI, 5 fracciones I, II, V y VII, 9 fracciones I, VI, XIV, XVI, XIX y XX, 29, 31, 52 y 72 de la Ley General de Vida Silvestre; artículos 19 fracciones XXIII, XXIV y XXV, 31 fracciones I, VI, XX, XXI y XII del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, esta Dirección General de Vida Silvestre **ordena a usted realizar un diagnóstico de las poblaciones de Cocodrilos (*Crocodylus spp.*) con miras a su control no letal** en la referida Laguna de Alcu zahue, en el Municipio de Tecomán, Colima, con las siguientes

Condiciones:

1. Este documento tendrá una vigencia de 60 días naturales a partir de la fecha de su expedición.
2. Las actividades encomendadas por el presente documento, se podrán realizar únicamente en la Laguna de Alcu zahue, y en sus perímetros hasta por 1 km. de distancia del margen máximo del cauce del cuerpo de agua, contando en dado caso con la anuencia de los propietarios de los predios involucrados.
3. Para la realización del diagnóstico de las poblaciones se autoriza la captura de ejemplares de cocodrilos para la determinación de su especie y su marcaje. Los ejemplares de **Cocodrilo de Río (*Crocodylus acutus*)** deberán ser inmediatamente liberados en el mismo sitio de su captura, mientras que los ejemplares de **Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*)** que se capturen, serán trasladados al Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) "Guadalajara" para su custodia en tanto se determine su destino final, como parte de las medidas de control aplicables a esta especie exótica.

... continúa en Hoja 2 ...

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1 COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. Á. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-35-88



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

OFICIO No. SGPA/DGVS/ 11943
Hoja 2 de 2.-

México, D.F., a 12 NOV. 2004

4. Deberán adoptarse medidas de trato digno y respetuoso para evitar o disminuir estados de tensión o sufrimiento excesivo que se pudiera ocasionar a los ejemplares objeto de estudio y/o control.
5. En todo momento deberá mantener comunicación y coordinación con el Departamento de Control de Poblaciones Perjudiciales y Centros de Fomento de esta dirección general sobre las estrategias a aplicarse y los avances logrados.

En un plazo no mayor a 15 días hábiles, una vez concluida la vigencia del presente documento, deberá presentar a esta Dirección General con copia a la Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Colima, un informe detallado de las actividades realizadas, sin perjuicio de los informes parciales que considere conveniente presentar. La información obtenida será sustento para que esta unidad administrativa, en uso de las atribuciones que le confiere el artículo 72 de la Ley General de Vida Silvestre, determine y dicte las medidas de control definitivas que habrán de aplicarse a la población exótica de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) en la Laguna de Alcuahue y sus alrededores, además de las medidas de control necesarias para resolver la problemática presentada a través de la Delegación Federal de la SEMARNAT en Colima, por el Presidente Municipal de Tecomán y los integrantes de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Laguna de Alcuahue".

ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL, CONFORME AL ARTÍCULO 154
DEL REGLAMENTO INTERIOR DE LA SEMARNAT, FIRMA EL PRESENTE
EL DIRECTOR DE OPERACIONES DE CAMPO
Y CONVENIOS DE CONSERVACIÓN


OSCAR RAMÍREZ FLORES



- C.c.p.: C. Francisco Giner de los Ríos, Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Blvd. Adolfo Ruiz Cortínez # 4209, 6° piso, Col. Jardines en la Montaña, Del. Tlalpan, 14210 México, D.F.-
C. José Bernal Stoopen, Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA.- Camino al Ajusco # 200, 6° piso, Col. Jardines en la Montaña, Del. Tlalpan, 14210 México, D.F.-
C. Felipe Ramírez Ruiz de Velasco, Director General de Vida Silvestre.- Edificio.-
C. Raúl Arredondo Nava, Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Colima.- Victoria # 360, Int. 105, Col. Centro, 28000 Colima, Col.- En atención al oficio No. SGPARN.-523/04.-
C. Alberto Eloy García Alcaraz, Delegado Federal de la PROFEPA en el Estado de Colima.- Manuel Acuña # 4930, Col. Lomas de Circunvalación, 28010 Colima, Col.-
C. Antonio Gómez Mendieta, Director de Sanidad, Control y Fomento de Vida Silvestre.- Edificio.-
C. Roberto A. Wolf Webels, Jefe del Departamento de Control de Poblaciones Perjudiciales y Centros de Fomento.- Edificio.-
C. Andrés González Rodríguez, Coordinador del CIVS "Guadalajara".- Presente.-
Archivo (Turno 01578 del 26-Mzo-2004).

AGM/AGO/PA/WW/vsrwce04.056

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1 COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. Á. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-35-88



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO No. SGPA/DGVS/ 04026

Hoja 1 de 2.-

México, D.F., a 29 ABR. 2005

Comand

**JAIME LUNA AGUIRRE,
CENTRO PARA LA CONSERVACIÓN E
INVESTIGACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE
"GUADALAJARA"**

Presente.-

En seguimiento al similar No. SGPA/DGVS/11943 del 12 de noviembre de 2004, con fundamento en los artículos 32-bis fracciones I, II, III, V, XXXIX y XLI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 5 fracciones I, II y III, 79 fracciones I, II, III y VI y 80 fracción I de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 1, 2, 3 fracciones XIII y XVI, 5 fracciones I, II, V y VII, 9 fracciones I, VI, XIV, XVI, XIX y XX, 29, 31, 52 y 72 de la Ley General de Vida Silvestre; artículos 19 fracciones XXIII, XXIV y XXV, 31 fracciones I, VI, XX, XXI y XII del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, esta Dirección General de Vida Silvestre **ordena a usted realizar un diagnóstico de las poblaciones de Cocodrilos (*Crocodylus spp.*) con miras a su control no letal** en la referida Laguna de Alcuahue, en el Municipio de Tecomán, Colima, con las siguientes

Condiciones:

1. Este documento tendrá una vigencia hasta el 31 de diciembre de 2005.
2. Las actividades encomendadas por el presente documento, se podrán realizar únicamente en la Laguna de Alcuahue, y en sus perímetros hasta por 1 km. de distancia del margen máximo del cauce del cuerpo de agua, contando en dado caso con la anuencia de los propietarios de los predios involucrados.
3. Para la realización del diagnóstico de las poblaciones se autoriza la captura de ejemplares de cocodrilos para la determinación de su especie y su marcaje. Los ejemplares de **Cocodrilo de Río (*Crocodylus acutus*)** deberán ser inmediatamente liberados en el mismo sitio de su captura, mientras que los ejemplares de **Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*)** que se capturen, serán trasladados al Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) "Guadalajara" para su custodia en tanto se determine su destino final, como parte de las medidas de control aplicables a esta especie exótica.
4. Deberán adoptarse medidas de trato digno y respetuoso para evitar o disminuir estados de tensión o sufrimiento excesivo que se pudiera ocasionar a los ejemplares objeto de estudio y/o control.
5. En todo momento deberá mantener comunicación y coordinación con el Departamento de Control de Poblaciones Perjudiciales y Centros de Fomento de esta dirección general sobre las estrategias a aplicarse y los avances logrados.

ASMIAGO/PA/ST/VS/wf/05.027

... continúa en Hoja 2 ...

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1 COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. Á. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-36-88



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

OFICIO No. SGPA/DGVS/04026

Hoja 2 de 2.-

México, D.F., a 29 ABR. 2005

En un plazo no mayor a 15 días hábiles, después de cada expedición y una vez concluida la vigencia del presente documento, deberá presentar a esta Dirección General con copia a la Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Colima, un informe detallado de las actividades realizadas. La información obtenida será sustento para que esta unidad administrativa, en uso de las atribuciones que le confieren los artículos 72 de la Ley General de Vida Silvestre y 31 fracciones VI y XX del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, determine y dicte las medidas de control definitivas que habrán de aplicarse a la población exótica de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) en la Laguna de Alcu zahue y sus alrededores, además de las medidas de control necesarias para resolver la problemática presentada a través de la Delegación Federal de la SEMARNAT en Colima, por el Presidente Municipal de Tecomán y los integrantes de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Laguna de Alcu zahue".

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo,

**ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL, CONFORME AL ARTÍCULO 154
DEL REGLAMENTO INTERIOR DE LA SEMARNAT, FIRMA EL PRESENTE
EL DIRECTOR DE OPERACIONES DE CAMPO
Y CONVENIOS DE CONSERVACIÓN**


OSCAR RAMÍREZ FLORES



- C.c.p.: C. Francisco Giner de los Ríos, Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Blvd. Adolfo Ruiz Cortinez # 4209, 6° piso, Col. Jardines en la Montaña, Del. Tlalpan, 14210 México, D.F.-
C. José Bernal Stopen, Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA.- Camino al Ajusco # 200, 6° piso, Col. Jardines en la Montaña, Del. Tlalpan, 14210 México, D.F.-
C. Felipe Ramírez Ruiz de Velasco, Director General de Vida Silvestre.- Edificio.-
C. Raúl Arredondo Nava, Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Colima.- Victoria # 360, Int. 105, Col. Centro, 28000 Colima, Col.- En atención al oficio No. SGPARN.-523/04.-
C. Alberto Eloy García Alcaraz, Delegado Federal de la PROFEPA en el Estado de Colima.- Manuel Acuña # 4930, Col. Lomas de Circunvalación, 28010 Colima, Col.-
C. Antonio Gómez Mendieta, Director de Sanidad, Control y Fomento de Vida Silvestre.- Edificio.-
C. Roberto A. Wolf Webeis, Jefe del Departamento de Control de Poblaciones Perjudiciales y Centros de Fomento.- Edificio.-
C. Andrés González Rodríguez, Coordinador del CIVS "Guadalajara".- Presente.-
Archivo (En seguimiento al oficio No. SGPA/DGVS/11943 del 12/Nov./2004).


AGM/AGO/RAM/AN/vst/wof05.027

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1 COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. Á. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-35-88

Anexo C: Permiso de depósito y experimentación para el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*).



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO No. SGPA/DGVS/01373 /06

México, D.F., 03 MAR. 2006

Comced
BHU

"2006, Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García"

DR. GUILLERMO M. ZÚÑIGA GONZÁLEZ
INVESTIGADOR DEL LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS DEL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE,
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SIERRA MOJADA # 800
COL. INDEPENDENCIA
44340 GUADALAJARA, JAL.

En respuesta a su escrito de fecha 6 de octubre de 2005, recibido en esta Dirección General el 17 de octubre del mismo año, con número de documento DGVS-05676/0510, mediante el cual se solicitan ejemplares de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*), con la finalidad de que los mismos sean utilizados para realizar la fase experimental del proyecto denominado "Eritrocitos con prolongaciones nucleares: nueva alternativa para detectar genotóxicos", a realizarse en el Laboratorio de Mutagénesis del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, informo a usted lo siguiente:

Esta unidad administrativa a mi cargo, no tiene inconveniente en autorizar el depósito de cocodrilos de la especie *Crocodylus moreletii*, en ese centro de investigación, para la realización del proyecto arriba señalado. Los ejemplares provendrán del Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) "Guadalajara", quedando sujeta la entrega de los ejemplares a la disponibilidad de los mismos (incluyendo los ejemplares que se capturen en el marco de las acciones de control de poblaciones exóticas que se llevan a cabo en la zona), y que se hará constar mediante la firma de las Actas de Entrega-Recepción correspondientes, de acuerdo a las siguientes condiciones:

1. El presente documento es personal e intransferible y junto con el Acta de Entrega-Recepción de cada caso, deberá acompañar invariablemente a los ejemplares amparados, debiendo el portador mostrar una identificación oficial a petición de las autoridades competentes.
2. El depósito administrativo tendrá vigencia hasta el 31 de diciembre de 2007.
3. En los primeros 10 días hábiles de cada semestre natural, el depositario presentará a esta dirección general informes sobre los avances del proyecto de investigación y el estado general que guardan los ejemplares en depósito. Al término de vigencia del depósito, se evaluará la condición y perspectiva de los animales para proponer a esta unidad administrativa lo conducente.
4. La alimentación y cuidado de los ejemplares quedará totalmente bajo responsabilidad del depositario.
5. Durante el proceso de investigación se adoptarán las medidas de trato digno y respetuoso para evitar o disminuir la tensión, sufrimiento y dolor que se les pudiera ocasionar a los ejemplares.
6. Los ejemplares en cuestión, deberán destinarse única y exclusivamente para el fin mencionado en este documento.
7. Durante la vigencia del depósito, los ejemplares no podrán ser objeto de liberación. Tampoco podrán ser objeto de donación, venta o cualquier otra forma de enajenación, de lo cual el depositario deberá responder en los términos del artículo 383 fracción II del Código Penal Federal.

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1 COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. A. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-36-42



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

OFICIO No. SGPA/DGVS/01373 /06
Hoja 2 de 2.-

México, D.F., 03 MAR. 2006

8. La Dirección General de Vida Silvestre se reserva el derecho de realizar a través de personal de la SEMARNAT debidamente acreditado, visitas técnicas de supervisión en cualquier momento y sin previo aviso, a fin de constatar el cumplimiento de las presentes condicionantes.
9. La validez de este documento queda condicionada al cumplimiento de las disposiciones técnico-administrativas y de sanidad exigidas por las autoridades competentes.

La inobservancia o contravención de cualquiera de las disposiciones establecidas en el presente documento, dará lugar a la revocación del mismo, sin perjuicio de las sanciones administrativas y/o penales correspondientes.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCION
EL DIRECTOR GENERAL**

Felipe Ramírez Ruiz de Velasco
FELIPE RAMÍREZ RUIZ DE VELASCO



- c.c.p.: C. Felipe Adrián Vázquez Gálvez, Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Boulevard Adolfo Ruíz Cortínez No. 4209, primer piso, ala A, Col. Jardines en la Montaña, Delegación Tlalpan, 14210 México, D.F.
- C. José de Jesús Álvarez Carrillo, Delegado de la SEMARNAT en el Estado de Jalisco.- Av. Alcalde No. 500, pisos 2º y 8º, Palacio Federal, Col. Alcalde Barranquitas, Centro, 44280 Guadalajara, Jal.
- C. José Trinidad Muñoz Pérez, Delegado de la PROFEPA en el Estado de Jalisco.- Av. Topacio No. 2525, Col. Fracc. Bosques de la Victoria, 44540 Guadalajara, Jal.
- C. Antonio González Origel, Subdirector de Sanidad.- Edificio.-
- C. Roberto A. Wolf Webels, Jefe del Departamento de Control y Remediación.- Edificio.-
- C. Andrés González Rodríguez, Coordinador del Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) "Guadalajara".- Calle Monte Colli # 406, Col. Estadio Poniente, 44220 Guadalajara, Jal.

Archivo (DGVS-05676/0510)

ARC/AGO/RAV/W/fdrv/vsdrv.of.06.03

AV. REVOLUCIÓN 1425 NIVEL 1. COL. TLACOPAC, SAN ÁNGEL
DELEG. Á. OBREGÓN C.P. 01040
TEL. 56-24-36-52 FAX 56-24-36-42

Anexo D: Acta de devolución de ejemplares de vida silvestre.

SUBSECRETARIA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN
AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
CENTRO PARA LA VIDA SILVESTRE (CIVS)
GUADALAJARA

ACTA DE DEVOLUCIÓN DE EJEMPLARES DE VIDA SILVESTRE

Constituidos en Monte Colli 406, Col. Estadio Poniente en Guadalajara, Jalisco siendo las 13:40 hrs del día 26 de septiembre de 2006, se constituyeron el Dr. en C. Guillermo Zúñiga González investigador del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social y el MVZ Andrés González Rodríguez Coordinador del Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre en Guadalajara, con objeto de hacer la devolución de 10 ejemplares de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). De acuerdo a las siguientes

DECLARACIONES

1.- Que habiendo concluido los experimentos para los cuales fueron solicitados 10 ejemplares de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) como parte del proyecto de investigación del Laboratorio de Mutagenesis del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, mediante número de registro 1305-2005-04 según autorización del oficio SGPA/DGVS/01373/06 emitido por la Dirección General de Vida Silvestre, se remiten a este Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre con fecha 26 de septiembre del año en curso.

2.- Que el CIVS Guadalajara recibe en buenas condiciones generales 10 ejemplares de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) de diferentes tallas y pesos con promedios de 40 cm y 150 grs de peso, mismos que serán incorporados al resguardo del CIVS, para determinar su destino final. Estos ejemplares corresponden al programa de control de poblaciones efectuado en la Laguna de Alcazahue, Colima, realizado por personal adscrito a este CIVS Guadalajara.

Sin otro asunto que tratar se concluye la presente acta siendo las 14:10 hrs del día de su inicio, misma que una vez que fue leída por los que en ella intervienen, se firma al calce.

Guadalajara, Jalisco a 26 de septiembre de 2006

DR. en C. GUILLERMO ZÚÑIGA GONZÁLEZ

MVZ ANDRÉS GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

TESTIGOS

DRA. en C. ANA LUORDES ZAMORA PEREZ

MVZ JAIME LUNA AGUIRRE

Anexo E: Productos generados a partir de esta tesis Doctoral

- Publicación de un artículo de investigación original.
 - Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Ramos-Ibarra ML, Torres-Bugarín O, Batista-González CM, Zúñiga-González GM. Avian Pathol. 2006;35:206-210.

- Obtención del segundo lugar en la exposición de carteles de investigación en la categoría Formal, Científica y Tecnológica, dentro de las jornadas académicas: “La Importancia de la Consolidación de Cuerpos Académicos de la Calidad de la UAG”, llevadas a cabo en la Universidad Autónoma de Guadalajara del 3 al 6 de julio del 2006.

Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage

Belinda C. Gómez-Meda^{1*}, Ana L. Zamora-Perez¹, Jaime Luna-Aguirre^{2,3}, Andrés González-Rodríguez², M. Luisa Ramos-Ibarra^{1,4}, Olivia Torres-Bugarín⁵, Cecilia M. Batista-González^{1,4} and Guillermo M. Zúñiga-González¹

¹Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Sierra Mojada 800, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México, ²Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre, Dirección General de Vida Silvestre, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Guadalajara, Jalisco, México, ³Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México, ⁴Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara—Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Guadalajara, Jalisco, México, and ⁵Departamento de Investigación, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

Nuclear abnormalities in erythrocytes, as micronuclei and nuclear buds (BE), are considered potential biomarkers of genotoxic exposure. We described previously the frequency of spontaneous micronucleated erythrocytes (MNE) in the species *Aratinga canicularis*. Here, we have used this species to evaluate the induction of MNE and BE by mitomycin-C. Animals were given a single intracoelomic injection of 0, 2, 3 or 4 mg/kg mitomycin-C on two consecutive days. A drop of blood was obtained after 0, 24, 48 and 72 h, and stained smears were used to count micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and polychromatic erythrocytes with buds (BPCE)/1000 polychromatic erythrocytes. The number of MNE and BE in 10 000 total erythrocytes was also counted. MNPCE and BPCE frequencies were elevated at 24, 48, and 72 h after the administration of the lower dose ($P < 0.03$). At a 3 mg/kg dose, the frequency of MNPCE increased at 48 and 72 h ($P < 0.04$) whereas the number of BPCE increased, but not significantly. Administration of 4 mg/kg mitomycin-C increased the number of MNE observed at 72 h ($P < 0.03$), the number of MNPCE at 48 h ($P < 0.01$) and 72 h ($P < 0.006$), the BE frequency at 72 h ($P < 0.05$), and the frequency of BPCE at 48 and 72 h ($P < 0.001$). While mitomycin-C appears to produce a parallel increase in MNPCE and BPCE frequencies, the MNE seemed to be a more sensitive indicator of genotoxicity than the BE. This suggests that evaluating BE and MNE in routine haematological analysis should be considered to evaluate environmental genotoxic exposure.

Introduction

One cytological abnormality that has been studied as an indicator of pathological alterations in certain diseases is the appearance of cells with nuclear buds (BE) (Torres-Bugarín *et al.*, 2004). We previously determined the frequency with which spontaneous micronucleated erythrocytes (MNE) appear in the species *Aratinga canicularis* (Zúñiga-González *et al.*, 2000). Interestingly, we observed a high frequency of BE (unpublished data), and, as a result, it is important to determine whether the presence of these abnormal erythrocytes may be inherent to this species or whether a genotoxic agent could have induced the appearance of such structures.

The micronucleus test is a relatively straightforward test to perform *in vivo* and as such it has been widely used. It produces reproducible results and it is adaptable to different tissues and animal species, including domestic birds on which the assay has been performed in bone marrow cells (Jena & Bhunya, 1995). Moreover, internationally accepted guidelines have been established to carry out this assay (Schmid, 1975; Hayashi *et al.*, 2000;

Zúñiga-González *et al.*, 2003a). More recently, nuclear protrusions or buds have been described as potential biomarkers of genotoxicity (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001; Montero *et al.*, 2003). In certain species, nuclear buds can be observed in preparations used to evaluate the presence of micronucleus and they could potentially serve as a complementary measure of genotoxicity.

Mitomycin-C is a cytotoxic antineoplastic agent that acts through similar mechanisms to those used by alkylating agents. It is commonly used as a positive control in genotoxicity assays (Jena & Bhunya, 1995). In its active form, mitomycin-C selectively inhibits DNA synthesis, and this inhibition is the result of DNA alkylation and cross-linking. Mitomycin-C also inhibits RNA and protein synthesis, albeit to a lesser degree (McVan, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

In the present study, we have used the species *A. canicularis* to determine whether the frequency of both MNE and BE increases after treatment with the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 33 36189410. Fax: +52 33 36181756. E-mail: mutagenes95@hotmail.com
ISSN 0307-9457 (print)/ISSN 1465-3338 (online)/06/30206-05 © 2006 Houghton Trust Ltd
DOI: 10.1080/03079450600711003

model genotoxin, mitomycin-C, as previously observed in pig and human lymphocyte cultures (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001).

Materials and Methods

Animals. Twenty-eight birds (*A. canicularis*) were used in this study. The animals belong to the "Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre de Guadalajara" (The Wildlife Research and Conservation Center, Guadalajara) of the "Dirección General de Vida Silvestre, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Jalisco, México" (Wildlife Office, Environment and Natural Resources Department, Jalisco, México), the Mexican federal Department that is in charge of environment and natural resources. This Center is responsible for the preservation of exotic and wild species confiscated from the illegal trafficking. Its aim is to rehabilitate and liberate the animals into their natural environment where possible. However, where the animals do not complete their rehabilitation (often due to causes such as fractures that are not well consolidated and wounds or mutilations) and it is not possible to liberate them, they are maintained in appropriate conditions of captivity and used for research purposes such as the study carried out here.

The animals used were apparently healthy at the time of sampling upon veterinary examination. Both males and female birds were used and they were of variable weights (mean 75.9 ± 5.9 g). Upon receipt, the birds were identified with a number and registered. After acclimatizing to the laboratory conditions for a minimum of 9 days, the birds were randomly divided into four groups of seven birds each (negative control and three treatment groups; Tables 1 and 2). The birds were housed in steel cages ($54 \times 30 \times 36$ cm, seven birds per cage), and provided with water and food (sunflower seeds) *ad libitum*.

Animal treatment. The animals in the control group were given 0.2 ml sterile water intracoelomic and the birds in groups 1 to 3 were given a single intracoelomic injection of 2, 3 or 4 mg mitomycin-C/kg (CAS No. 50-07-7; Sigma, St Louis, Missouri, USA) on two consecutive days. The doses were selected on the basis of the effects described in the literature (Jena & Bhunya, 1995). All doses were adjusted to a final volume of 0.2 ml with sterile water. All the animals were handled in accordance with institutional guidelines and National and International Institutes of Health regulations for the humane treatment of research animals.

Blood collection and sample preparation. At 0, 24, 48 and 72 h, a drop of peripheral blood was obtained from the tip of the nail of each bird, and it was smeared on two pre-cleaned and pre-coded microscope slides. The smears were air-dried, fixed in absolute ethanol for 10 min and stained with acridine orange (CAS No. 10127-02-3; Sigma). Acridine orange was used at a concentration of 0.02 mg/ml in phosphate buffer (pH 7.4) (Zúñiga-González *et al.*, 2003a).

Sample analysis. The samples were evaluated by the same researcher and they were scored manually using an OLYMPUS CX31 microscope equipped with epifluorescence and an oil-immersion objective (100 x). The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and polychromatic erythrocytes with nuclear buds (BPCE) were determined in 1000 polychromatic erythrocytes (PCE). The numbers of MNE and BE were also determined in 10 000 total erythrocytes and the number of PCE in 1000 total erythrocytes was also counted. Acridine orange stained the PCE red or orange, while normochromatic or mature erythrocytes were stained dark green.

MNE were counted only when the micronucleus was clearly separated from the main nucleus and had a round shape (Figure 1a). Buds were counted when an elongation from the nucleus originated from the nucleus, partially overlapped the nucleus, or was in the form of drop having an obtuse (or presumed) strand connecting it to the nucleus (Figures 1b to 1d).

Statistical analysis. The results are presented as the mean \pm standard deviation. The data were compared statistically using the SPSS medical software package (version 11.0 for Windows; SPSS, Chicago, Illinois, USA). After establishing the normal distribution of the data, comparisons were made between each treatment group and their respective basal value (0 h) by means of repeated-measures analysis of variance. Subsequently, a least significance difference test was applied to correct the significance values of the multiple *post hoc* pairwise comparisons. $P < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

In the present study, the frequencies of MNE, MNPCE, BE and BPCE were measured in mitomycin-C treated parrots to determine whether these parameters increased in a similar manner *in vivo* as they were previously seen to in pig and human lymphocyte cultures (Serrano-

Table 1. Effect of mitomycin-C on the frequencies of MNE, MNPCE, and PCE in nucleated erythrocytes of treated birds

Group	n	Sampling time			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Control (water only)	7				
MNE/10 000 TE		3.0 \pm 3.6	2.1 \pm 2.1, NS	2.1 \pm 2.1, NS	1.7 \pm 2.9, NS
MNPCE/1000 PCE		0.4 \pm 0.7	0.2 \pm 0.7, NS	0 \pm 0, NS	0.5 \pm 1.1, NS
PCE/1000 TE		91.7 \pm 14.7	111.8 \pm 14.3, $P < 0.003$	122.5 \pm 34.4, $P < 0.04$	117.4 \pm 56.0, NS
2 mg/kg mitomycin-C	7				
MNE/10 000 TE		4.1 \pm 4.0	5.2 \pm 2.8, NS	6.0 \pm 3.3, NS	3.5 \pm 1.8, NS
MNPCE/1000 PCE		0.1 \pm 0.3	1.0 \pm 1.0, $P < 0.007$	1.8 \pm 1.2, $P < 0.02$	2.7 \pm 1.6, $P < 0.01$
PCE/1000 TE		75.2 \pm 9.7	70.0 \pm 8.4, NS	69.1 \pm 9.2, NS	45.2 \pm 14.9, $P < 0.004$
3 mg/kg mitomycin-C	7				
MNE/10 000 TE		3.4 \pm 2.6	5.0 \pm 5.1, NS	5.2 \pm 2.2, NS	3.1 \pm 2.3, NS
MNPCE/1000 PCE		0.2 \pm 0.4	1.1 \pm 1.6, NS	3.1 \pm 2.8, $P < 0.03$	1.5 \pm 0.9, $P < 0.04$
PCE/1000 TE		81.0 \pm 24.9	75.2 \pm 13.3, NS	68.4 \pm 16.3, NS	64.5 \pm 19.7, NS
4 mg/kg mitomycin-C	7				
MNE/10 000 TE		2.8 \pm 2.4	2.8 \pm 1.3, NS	3.8 \pm 1.5, NS	6.0 \pm 2.5, $P < 0.03$
MNPCE/1000 PCE		0.5 \pm 0.7	0.7 \pm 0.4, NS	2.8 \pm 1.8, $P < 0.01$	6.0 \pm 2.7, $P < 0.006$
PCE/1000 TE		86.7 \pm 6.8	108.7 \pm 23.2, $P < 0.03$	82.2 \pm 8.2, NS	35.7 \pm 14.7, $P < 0.001$

Data are expressed as the mean \pm standard deviation. MNE, micronucleated erythrocytes; MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE, polychromatic erythrocytes; TE, total erythrocytes; n, sample size; NS, not significant. Comparisons were made between the basal value (0 h) and the times following the treatment and were analysed for significance using repeated-measures analysis of variance, followed by a least significance difference test. All doses were adjusted to a final volume of 0.2 ml with sterile water.

Table 2. Effect of mitomycin-C on the frequencies of BE, BPCE, and PCE in nucleated erythrocytes of treated birds

Group	n	Sampling time			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Control (water only)	7				
BE/10 000 TE		12.8±21.4	11.1±20.8, NS	8.1±9.3, NS	5.5±5.8, NS
BPCE/1000 PCE		6.0±6.3	5.1±7.4, NS	8.0±11.1, NS	2.8±2.6, NS
PCE/1000 TE		91.7±14.7	111.8±14.3, <i>P</i> < 0.003	122.5±34.4, <i>P</i> < 0.04	117.4±56.0, NS
2 mg/kg mitomycin-C	7				
BE/10 000 TE		14.4±13.4	22.4±18.9, NS	36.5±25.4, NS	22.5±13.9, NS
BPCE/1000 PCE		3.7±3.0	7.7±3.9, <i>P</i> < 0.006	18.4±10.5, <i>P</i> < 0.01	16.0±12.4, <i>P</i> < 0.03
PCE/1000 TE		75.2±9.7	70.0±8.4, NS	69.1±9.2, NS	45.2±14.9, <i>P</i> < 0.003
3 mg/kg mitomycin-C	7				
BE/10 000 TE		17.4±19.3	19.1±14.0, NS	17.0±11.6, NS	11.5±6.0, NS
BPCE/1000 PCE		6.8±4.4	8.4±9.7, NS	9.2±6.1, NS	17.8±15.2, NS
PCE/1000 TE		81.0±24.9	75.2±13.3, NS	68.4±16.3, NS	64.5±19.7, NS
4 mg/kg mitomycin-C	7				
BE/10 000 TE		8.8±6.8	12.2±5.9, NS	17.1±8.6, NS	14.2±4.4, <i>P</i> < 0.05
BPCE/1000 PCE		2.7±2.2	3.0±1.5, NS	16.0±5.2, <i>P</i> < 0.001	28.1±8.2, <i>P</i> < 0.001
PCE/1000 TE		86.7±6.8	108.7±23.2, <i>P</i> < 0.03	82.2±8.2, NS	35.7±14.7, <i>P</i> < 0.04

Data are expressed as the mean ± standard deviation. BE, erythrocytes with nuclear buds; BPCE, polychromatic erythrocytes with buds; PCE, polychromatic erythrocytes; TE, total erythrocytes; n, sample size; NS, not significant. Comparisons were made between the basal value (0 h) and the times following the treatment and were analysed for significance using repeated-measures analysis of variance, followed by a least significance difference test. All doses were adjusted to a final volume of 0.2 ml with sterile water.

García & Montero-Montoya, 2001). No significant differences were observed in the frequencies of MNE and BE from control animals at the different sampling times, indicating that the stress of the manipulation did not affect either of these measures. However, the PCE frequency did increase in control samples 24 h (*P* < 0.003) and 48 h (*P* < 0.04) after treatment, and this variation could be related to compensatory cell division in the bone marrow caused by sampling. A similar increase was seen after 24 h in the animals treated with 4 mg/kg mitomycin-C. However, a reduction in PCE frequency was more commonly observed 72 h after exposure to the compound. These decreases in PCE frequency could reflect the bone marrow toxicity of the drug (Tables 1 and 2).

At a dose of 2 mg/kg, mitomycin-C significantly increased the frequency of MNPCE and BPCE at 24, 48, and 72 h (*P* < 0.03), while MNE and BE frequencies did not increase at any of these sampling times. Exposure to 3 mg/kg compound did not affect the numbers of MNE or BE found at any of the sampling times. However, MNPCE frequencies increased significantly after 48 and 72 h (*P* < 0.04), and a non-significant increase in BPCE frequencies was observed. After 72 h, the frequency of MNE increased significantly when the animals were exposed to a dose of 4 mg/kg mitomycin-C (*P* < 0.03), as did the appearance of MNPCE at 48 h (*P* < 0.01) and 72 h (*P* < 0.006), that of BE at 72 h (*P* < 0.05), and the numbers of BPCE at 48 and 72 h (*P* < 0.001; Tables 1 and 2).

Depending on the species, the half-life of bird erythrocytes is approximately 20 to 45 days (Schalm, 1964). However, the half-life of an altered erythrocyte, such as a MNE, is shorter than that of a normal erythrocyte. In humans, the half-life of erythrocytes is approximately 120 days in circulation, although normal turnover times can be re-established within 5 to 10 days of exposure to a genotoxin (Heddle *et al.*, 1983; MacGregor *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1992, 2000; Vanparys *et al.*, 1992; Zúñiga-González *et al.*, 2003b).

Despite the fact that all the birds were maintained under the same conditions before the study, to eliminate the possible influence of a prior genotoxic exposure the parrots used in the present study were also kept under quarantine for a minimum of 9 days. This served as a period of adaptation to the experimental conditions.

The accumulation of MNE and MNPCE are parameters that are related to genotoxicity. An increase in the accumulation of MNPCE results from damage that occurs in the 24 to 48 h period after treatment (Heddle *et al.*, 1983) and, as such, MNPCE frequencies allow us to evaluate short periods of exposure (24 or 48 h). In contrast, MNE frequencies can be used to evaluate more chronic exposure, since the significant increases that can initially be observed by determining the MNPCE frequency are reflected 24 h later by changes in the MNE frequency.

The BE frequencies were consistently higher than the MNE frequencies (Tables 1 and 2), suggesting that budding may reflect to a wider spectrum of DNA damage than the formation of micronuclei. The increases observed in this assay suggest that while MNE and BE frequencies generally increase in parallel, MNE may be more sensitive than BE as a biomarker for the genotoxic effects of mitomycin-C. However, the large standard deviations obtained in the study make it difficult to conclude that BE constitute a less sensitive biomarker than MNE. This animal-to-animal variability reduced the overall sensitivity of the assay, and this was especially true when measuring the BE where higher numbers of events were counted. Since the animals were not obtained from a well-controlled animal facility, there are likely to have been differences in the sex and age of the birds. Even though the birds were of a similar weight, they were not necessarily of similar age, and it has been observed that age can influence the capacity of animals to remove MNE from circulation (Zúñiga-González *et al.*, 2001a, 2001b).

Parasites can also be found in many domestic avian species, such as doves, with no apparent negative effects

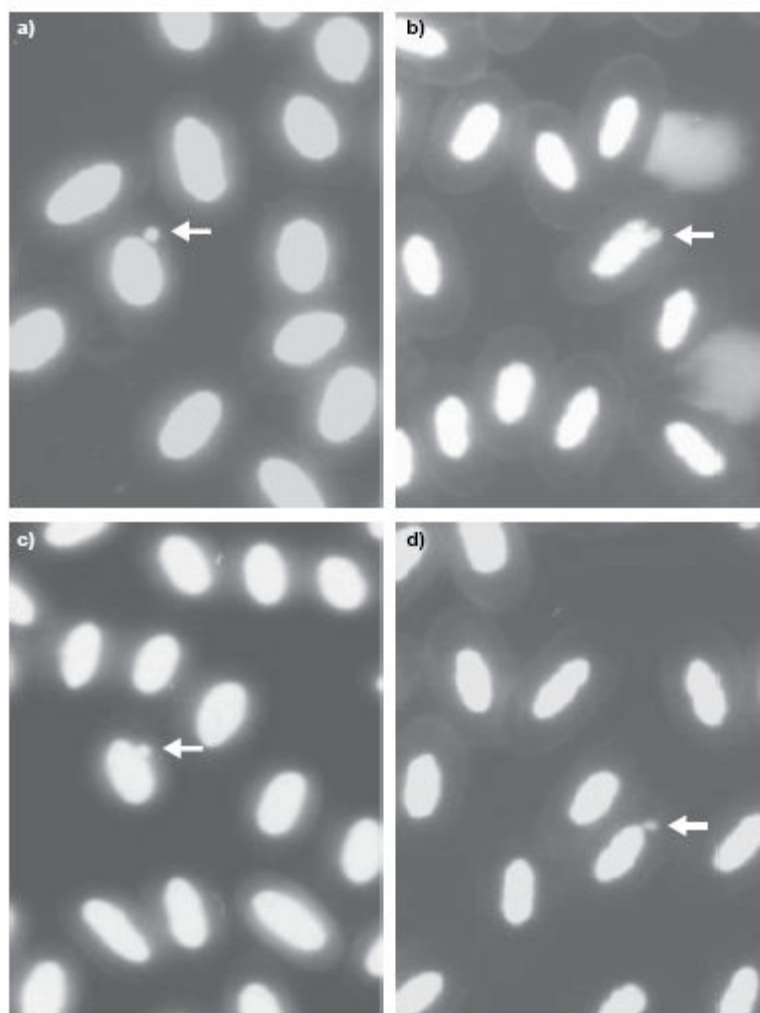


Figure 1. Peripheral blood nucleated erythrocytes of *Aratinga canicularis*. 1a: Micronucleated erythrocyte (100 x); 1b to 1d: Erythrocytes with nuclear buds (100 x).

on their health. However, infection by the parasite *Taenia solium cysticerci* is known to induce chromosomal aberrations, sister chromatid exchange and gene mutation, attributed to secretory parasitic molecules (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001). We found parasites of *Haemoproteus* sp. in some samples from these birds, although this had no apparent negative effects on their health. It is conceivable that the parasites in these birds could have provoked a series of events that might be responsible for the variability in the MNE and BE frequencies seen here.

Like birds, fishes, amphibians, and reptiles all have large nucleated, ellipsoidal erythrocytes, which could be used to determine environmental genotoxic damage by analysing the BE frequency. In this study, we have demonstrated that the model genotoxin mitomycin-C

increases the proportion of BPCE and MNPCE in the nucleated erythrocytes of parrots. Similar increases in nuclear bud frequencies have previously been reported in cell cultures (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001). Taken together, these results indicate that BE could be an alternative parameter to consider in genotoxicity studies of model species with nucleated erythrocytes, or when it is difficult to establish the spontaneous MNE frequency.

In conclusion, this study demonstrates the relationship between mitomycin-C exposure and an increase in BE. Hence, the scoring of BE in routine haematological analysis should be considered in order to establish normal values for this species and to evaluate environmental genotoxicity exposure.

Acknowledgements

The authors thank Ing. Rogelio Troyo Sanromán for assistance with the statistical analysis.

References

- Hayashi, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A.O. & Sofani, T. (1992). The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutation Research*, *278*, 209–213.
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Adler, I.D., Blakey, D.H., Dertinger, S.D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. & Saitou, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *35*, 234–252.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirshant, B.K., Mavorain, J.T., MacGregor, G., Newell, W. & Salamone, M.P. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, *123*, 61–118.
- Jena, G.B. & Bhunya, S.P. (1995). Use of chicks, *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'. *Mutation Research*, *334*, 167–174.
- MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B.H., Ramel, C., Salamone, M.P., Tice, R.R. & Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, *189*, 103–112.
- McVan, B.F. (1993). *Physician's Drug Handbook*. Pennsylvania, USA: Springhouse Corporation.
- Montero, R., Serrano, L., Dávila, V., Segura, Y., Arieta, A., Fuentes, R., Abad, I., Valencia, L., Sierra, P. & Camacho, R. (2003). Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *42*, 216–222.
- Pratt, W.B., Raddon, R.W., Ensminger, W.D. & Maybaum, J. (1994). *The Anticancer Drugs*, 2nd edn. New York: Oxford University Press.
- Schalm, O.W. (1964). *Respiratory Hematology*. Philadelphia, PA: Lea and Febiger.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, *31*, 9–15.
- Serrano-García, L. & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *38*, 38–45.
- Torres-Bugarín, O., Venturi-Aguilar, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Morgan-Villela, G., Gutiérrez-Franco, A. & Zúñiga-González, G. (2004). Evaluation of cisplatin+5-FU, carboplatin+5-FU, and ifosfamide+epirubicin regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutation Research*, *565*, 91–101.
- Vauparys, P., Deknadt, G., Vermeiren, F., Szymans, M. & Mambom, R. (1992). Sampling times in micronucleus testing. *Mutation Research*, *282*, 191–196.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Ramos-Mora, A., Ortiz, G.G. & Gallegos-Arreola, M.P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species. *Mutation Research*, *467*, 99–103.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Ramos-Ibarra, M.L., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Venturi-Aguilar, A.J., Ramos-Mora, A., Ortiz, G.G., Álvarez-Moya, C., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J. & Gallegos-Arreola, M.P. (2001a). Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *37*, 173–177.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D. & Gallegos-Arreola, M.P. (2001b). Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*, *494*, 161–167.
- Zúñiga-González, G., Gómez-Meda, B.C., Zamora-Perez, A., Ramos-Ibarra, M.L., Barista-González, C.M., Espinoza-Jiménez, S., Gallegos-Arreola, M.P., Álvarez-Moya, C. & Torres-Bugarín, O. (2003a). Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *42*, 306–310.
- Zúñiga-González, G.M., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Gallegos-Arreola, M.P., Flores-García, A. & López-Urbe, A. (2003b). Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-fluorouracil. *Archives of Medical Research*, *34*, 141–144.

Non-English Abstracts

Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage

Belinda C. Gómez-Meda^{1*}, Ana L. Zamora-Perez¹, Jaime Luna-Aguirre^{2,3}, Andrés González-Rodríguez², M. Luisa Ramos-Ibarra^{1,4}, Olivia Torres-Bugarín⁵, Cecilia M. Batista-González^{1,4} and Guillermo M. Zúñiga-González¹

¹Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Sierra Mojada 800, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México, ²Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre, Dirección General de Vida Silvestre, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Guadalajara, Jalisco, México, ³Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México, ⁴Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara—Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Guadalajara, Jalisco, México, and ⁵Departamento de Investigación, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

Anomalies nucléaires des érythrocytes de perroquet (*Aratinga canicularis*) associées aux lésions génotoxiques

Les anomalies nucléaires des érythrocytes, tels les micronuclei (MN) et les bourgeons nucléaires (BE), sont considérés être des marqueurs potentiels d'exposition génotoxique. Nous avons décrit précédemment la fréquence d'érythrocytes micronucléés spontanés (MNE) dans l'espèce *Aratinga canicularis*. Ici, nous avons utilisé cette espèce pour évaluer l'induction des MNE et des BE par la mitomycine-C.

Les animaux ont reçu une injection intracoelomique de 0, 2, 3 ou 4 mg/kg de mitomycine-C, deux jours consécutifs. Une goutte de sang a été recueillie après 0, 24, 48 et 72 h, et des frottis colorés ont été utilisés pour compter les érythrocytes polychromatiques micronucléés (MNPCE) et les érythrocytes polychromatiques avec des bourgeons (BPCE)/1.000 érythrocytes polychromatiques. Le nombre de MNE et de BE pour 10.000 érythrocytes a également été compté.

Les fréquences des MNPCE et des BPCE ont été évaluées à 24, 48, et 72 h après l'administration de la plus faible dose ($P < 0,03$). A la dose de 3 mg/kg, la fréquence des MNPCE a augmenté à 48 et 72 h ($P < 0,04$) alors que le nombre des BPCE a augmenté, mais pas significativement. L'administration de 4 mg/kg de mitomycine-C a augmenté le nombre des MNE observé à 72 h ($P < 0,03$), le nombre des MNPCE à 48h ($P < 0,01$) et à 72 h ($P < 0,006$), la fréquence des BE à 72 h ($P < 0,05$), et la fréquence des BPCE à 48 et 72 h ($P < 0,001$).

Alors que la mitomycine-C apparaît produire une augmentation parallèle des fréquences des MNPCE et des BPCE, les MNE paraissent être un indicateur plus sensible de la génotoxicité que les BE. Ceci suggère que l'évaluation des BE et des MNE lors des analyses hématologiques de routine devrait être prise en compte pour évaluer l'exposition génotoxique environnementale.

Kernanomalien in Erythrozyten von Papageien (*Aratinga canicularis*) im Zusammenhang mit genotoxischer Schädigung

Nukleäre Anomalien in Erythrozyten wie Mikronuklei (MN) und Kernknospen (-anlagen) (BE) werden als potentielle Biomarker für eine genotoxische Exposition angesehen. Kürzlich haben wir die Häufigkeit spontan auftretender Mikronuklei in Erythrozyten (MNE) in der Spezies (*Aratinga canicularis*, Orangerbrustsittich) beschrieben. In dieser Studie haben wir diese Spezies verwendet, um die Induktion von MNE und BE durch Mitomycin-C zu untersuchen. Den Tieren wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine Injektion von 0, 2, 3, oder 4 mg/kg Mitomycin-C in die Leibeshöhle gegeben. Nach 0, 24, 48 und 72 h wurde ein Tropfen Blut entnommen, ausgestrichen und gefärbt, um polychromatische Erythrozyten mit Mikronuklei (MNPCE) und polychromatische Erythrozyten mit Knospen (BPCE)/1000 polychromatische Erythrozyten auszuzählen. Die Zahl der MNE und BE in insgesamt 10000 Erythrozyten wurde auch bestimmt. 24, 48 und 72 h nach der Verabreichung war bei der niedrigen Dosierung die Häufigkeit von MNPCE und BPCE erhöht ($p < 0,03$). Bei der Dosis von 3 mg/kg stieg nach 48 und 72 h die Frequenz der MNPCE signifikant ($p < 0,04$) und der BPCE jedoch nicht signifikant an. Die Gabe von 4 mg/kg

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 33 36189410. Fax: +52 33 36181756. E-mail: mutagenesis95@hotmail.com
ISSN 0307-9457 (print)/ISSN 1465-3338 (online)/30001-02 © 2006 Houghton Trust Ltd
DOI: 10.1080/03079450600711003

Mitomycin-C steigerte die Zahl der MNE nach 72 h ($p < 0,03$), die Zahl der MNPCE nach 48 ($p < 0,01$) und 72 h ($p < 0,06$), die BE-Häufigkeit nach 72 h ($p < 0,05$) und die BPCE-Frequenz nach 48 und 72 h ($p < 0,001$). Während Mitomycin-C einen parallelen Anstieg der MNPCE- und BPCE-Häufigkeiten hervorzurufen scheint, sieht es so aus, als ob MNE ein sensitiverer Indikator für eine Genotoxizität als BE ist. Dies suggeriert, dass die Bewertung von BE und MNE in der hämatologischen Routinanalyse zur Bestimmung von genotoxischen Umweltrisiken berücksichtigt werden sollte.

Anormalidades del núcleo de eritrocitos de loros (*Anatinga canicularis*) relacionadas con daño genotóxico. Las anomalías nucleares en eritrocitos, como los micronúcleos (MN) y las protuberancias nucleares (BE), se consideran biomarcadores potenciales de exposición genotóxica. Previamente, hemos descrito la frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados (MNE) en las especies de *Anatinga canicularis*. En este estudio, hemos utilizado estas mismas especies para valorar la inducción de MNE y BE por mitomicina-C.

Los animales recibieron una única inyección intracelómica de 0, 2, 3 o 4 mg/kg de mitomicina-C en dos días consecutivos. Se obtuvo una gota de sangre tras 0, 24, 48 y 72h, y se utilizaron frotis teñidos para el recuento de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) y eritrocitos policromáticos con protuberancias (BPCE)/1000 eritrocitos policromáticos. También se realizó un recuento del número de MNE y BE en un total de 10,000 eritrocitos.

Las frecuencias de MNPCE y BPCE estaban incrementadas a las 24, 48 y 72h tras la administración de la dosis más baja ($P < 0,03$). A la dosis de 3 mg/kg, la frecuencia de MNPCE aumentó a las 48 y 72 h ($P < 0,04$) mientras que el número de BPCE aumentó, aunque no de manera significativa. La administración de 4 mg/kg de mitomicina-C produjo un incremento del número de MNE observados a las 72 h ($P < 0,03$), del número de MNPCE a las 48 ($P < 0,01$) y 72 h ($P < 0,006$), de la frecuencia de BE a las 72 h ($P < 0,05$), y de la frecuencia de BPCE a las 48 y 72 h ($P < 0,001$).

Mientras que la mitomicina-C induce un incremento paralelo de las frecuencias de MNPCE y BPCE, los MNE pueden ser un indicador más sensible de la genotoxicidad que los BE. Estos resultados sugieren que debería considerarse la valoración de los BE y MNE en los análisis hematológicos rutinarios como indicadores de la exposición genotóxica ambiental.

La Universidad Autónoma de Guadalajara

a través de la
Vicerrectoría Académica

otorga el presente

Reconocimiento

Dra. Olivia Torres Bugarin

con el proyecto «Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (Aratinga canicularis) related to genotoxic damage Avian Pathology» de la Unidad Académica de Ciencias de la Salud, Departamento de Investigación del ICB por haber obtenido el 2do. lugar en la exposición de carteles de Investigación en la categoría:

Formal, Científica y Tecnológica

en las Jornadas Académicas: "*La Importancia de la Consolidación*

de Cuerpos Académicos de la Calidad de la UAG", llevadas a cabo del 3 al 6 de julio.

Zapopan, Jalisco, a 6 de julio de 2006.

Dr. Néstor Velasco Pérez, D. Ed.
Vicerrector Académico



**Jornadas
Académicas**

Verano 2006