

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Veterinarias



Caracterización de eritrocitos micronucleados espontáneos en el delfín *Tursiops truncatus*

Tesis profesional

Para obtener el título de

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

P.M.V.Z. Claudia Vanessa Camacho Magaña

Director:

M. en C. Ana Lourdes Zamora Perez

Asesor:

Dra. en C. Belinda Claudia Gómez Meda

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Agosto 2004

Este trabajo se realizó en el

LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS

Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO)

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Guadalajara, Jalisco

Y en los delfinarios de la República Mexicana

Delfiniti de México, S. A. de C.V.

Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero

CIMMA

Centro Internacional de mamíferos marinos

Guadalajara, Jalisco

Cici

Acapulco, Guerrero

Colaboración:

Biol. Cecilia Margarita Batista González

M. en C. María Luisa Ramos Ibarra

Dr. en C. Guillermo M. Zúñiga González

BIBLIOTECA CUCBA

A la memoria de mi abuelito:

Rodolfo, por el ejemplo que me dio ante la vida, con todo mi amor.

A mis padres que Dios me dio:

Les dedico mi carrera, a mi "pap" y "ma" con profundo cariño por darme todo, su corazón, su mente y su ser, que siempre me empujó hacia adelante.

Al Laboratorio de Mutagénesis:

Memito, Belinda, Ma. Luisa y Cachorro, por la esperanza que me dan para continuar, gracias por su amabilidad y apoyo.

A Anira:

Como directora con respeto y como amiga con cariño y reconocimiento por el tiempo que me brindo para darle sazón a mi carrera.

Al Delfinario Delfiníti:

Ing. Mauricio Zendejas y al M.V.Z. Jorge Guzmán, con gratitud por todo su apoyo y sobre todo por la confianza que me brindaron.

Al delfinario Cici y CIMMA:

Doc. Jesús Arias, César y Martha, con respeto y cariño gracias por la oportunidad que me dieron para terminar lo que inicié.

Contenido

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i>	x
<i>Introducción</i>	1
<i>Planteamiento del problema</i>	14
<i>Justificación</i>	15
<i>Hipótesis</i>	16
<i>Objetivos</i>	17
<i>Materiales y métodos</i>	18
<i>Resultados</i>	23
<i>Discusión</i>	32
<i>Conclusiones</i>	39
<i>Bibliografía</i>	40
<i>Anexos</i>	46
✧ Glosario	46
✧ Preparación y análisis de las muestras	48

Índice de figuras, cuadros y gráficas

Página

Figuras

1. Eritrocitos micronucleados en sangre periférica de mamífero.	2
2. Formación de micronúcleos.	3
3. Células micronucleadas en diferentes tejidos.	4
4. Eritrocitos en diferentes especies.	6
5. Eritrocitos normocromáticos y policromáticos de mamífero.	7
6. Delfín <i>Tursiops truncatus</i> .	11
7. Sexado del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>).	12
8. Adiestramiento del delfín.	13
9. Toma de muestra de sangre periférica del delfín.	18
10. Materiales para la toma de la muestra.	19
11. Frotis de sangre periférica de delfín (<i>Tursiops truncatus</i>).	20
12. Diagrama de flujo.	22
13. EMNe y EPC de sangre periférica del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>).	23

Cuadros

I. Especies con mayor número de EMNe.	10
II. Clasificación taxonómica del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>).	11
III. Información general de los 12 delfines (<i>Tursiops truncatus</i>) muestreados.	25
IV. Número de EMNe y EPC de sangre periférica de los delfines.	26
V. Comparación del número de EMNe y EPC de sangre periférica entre delfines (<i>Tursiops truncatus</i>) hembras y machos.	27
VI. Comparación del número de EMNe del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>) entre los diferentes delfinarios.	27
VII. Comparación del número de EMNe del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>) en el tiempo.	28

Gráficas

1. Comparación del número de EMNe y EPC de sangre periférica entre delfines (<i>Tursiops truncatus</i>) hembras y machos.	30
2. Correlación entre el número de EMNe de sangre periférica y la edad del delfín (<i>Tursiops truncatus</i>).	30

	<i>Página</i>
3. Promedio \pm desviación estándar del número de EMNe en los 10 delfines (<i>Tursiops truncatus</i>) con más de una muestra.	31
4. Comparación del número de EMNe en el delfin (<i>Tursiops truncatus</i>) entre los diferentes delphinarios.	31

Resumen

La contaminación en diferentes ciudades del mundo ha sido asociada con el incremento en el riesgo de contraer cáncer. Varias actividades humanas aumentan la contaminación, como residuos de las minas, pesticidas y desechos urbanos, que pueden afectar ecosistemas marinos y subsecuentemente dañar al hombre a través de cadenas tróficas. 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. La observación de eritrocitos micronucleados espontáneos (EMNe) en sangre periférica depende de la efectividad del sistema reticuloendotelial para retirarlos de la circulación. El objetivo del trabajo fue el caracterizar la presencia de EMNe en sangre periférica del delfín (*Tursiops truncatus*) para proponerlo como un potencial bioindicador de genotóxicos, básicamente micronucleogénicos. Se obtuvieron 48 muestras de 12 delfines procedentes de tres delfinarios de México, con las cuales se elaboraron tres frotis por muestra. Las laminillas fueron teñidas con naranja de acridina y observadas mediante el microscopio de fluorescencia. El valor basal de EMNe de sangre periférica en el delfín fue de 24.3 ± 6.1 EMN/10,000 eritrocitos. Por otro lado, no se encontró diferencias significativas por género respecto al número de EMNe, sin embargo, se encontraron diferencia estadísticamente significativa en el número de EMNe entre el delfinario Delfiniti de México ($26.0 \pm 5.9/10,000$ eritrocitos), comparado con los delfinarios CIMMA ($19.5 \pm 3.1/10,000$ eritrocitos) ($p < 0.05$) y Cici ($18.6 \pm 3.5/10,000$ eritrocitos) ($p < 0.007$), que puede deberse a diferencias en el manejo. Por tanto, la presencia de EMNe en el delfín permitiría la evaluación del daño acumulado, mediante el conteo de EMN, y esto lo convierte en un mamífero marino potencial como centinela, tanto en cautiverio como en vida silvestre.

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, 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 ¹. Desde los años cuarenta se demostró que extractos de partículas llevadas por el viento pueden producir tumores en ratones y existen evidencias que sugieren que el desarrollo de tumores es un proceso de múltiples etapas que inicia con una mutación ².

Día a día se liberan compuestos al medio ambiente de los que se desconoce su genotoxicidad, lo que 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 ³, 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 ³.

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 el hombre ⁴, además pueden tener efectos teratogénicos ⁵, causar mutaciones en

células germinales ⁴, influir en procesos de envejecimiento ⁴ e inducir mutaciones en células somáticas que pueden desarrollar cáncer ^{6,7,8,9}.

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 ¹⁰. 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) ¹⁰. En el presente trabajo se utilizó la prueba de MN en eritrocitos de sangre periférica, que es una prueba sencilla, económica y altamente informativa ^{11,12}.

✧ *Prueba de micronúcleos.*

Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo en mitosis. En hematología, 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) ^{13,14,15} (ver figura 1).

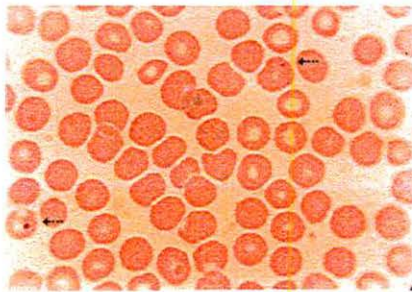


Figura 1. Eritrocitos micronucleados en sangre periférica de mamífero (Tinción wright y giemsa).

La prueba de MN sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados que al quedar fuera del núcleo forman estas estructuras ^{11,12}. La prueba permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas), como aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico) ^{15,16}, pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN ¹⁷ y presencia de centrómero ¹⁸. La formación de los MN se basa en el siguiente principio (ver figura 2): 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 (fragmentos o cromosomas completos) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios que son como regla mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí el nombre de MN ¹⁵.

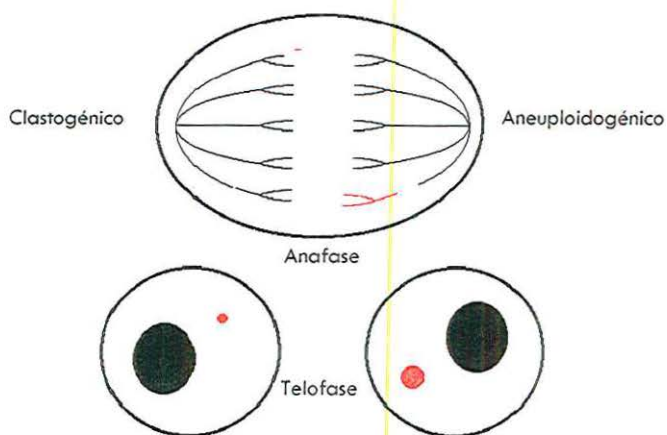


Figura 2. Formación de Micronúcleos.

Dentro de las ventajas de la técnica de MN se incluyen facilidad y rapidez, la abundancia de células analizables, y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase ^{11,15,19}.

La técnica de MN se ha realizado en diferentes especies ^{20,21} y en gran variedad de tejidos, ya que la condición esencial es que el tejido se divida, de esta manera es posible aplicarla en médula ósea, eritrocitos de sangre periférica ^{15,20,21,22}, linfocitos ^{16,23}, hepatocitos ²⁴, células germinales ²⁵, células de mucosa bucal de humano ²⁶, células de vagina de rata ²⁷, o células de la muda de ambystoma ²⁸ (ver figura 3).

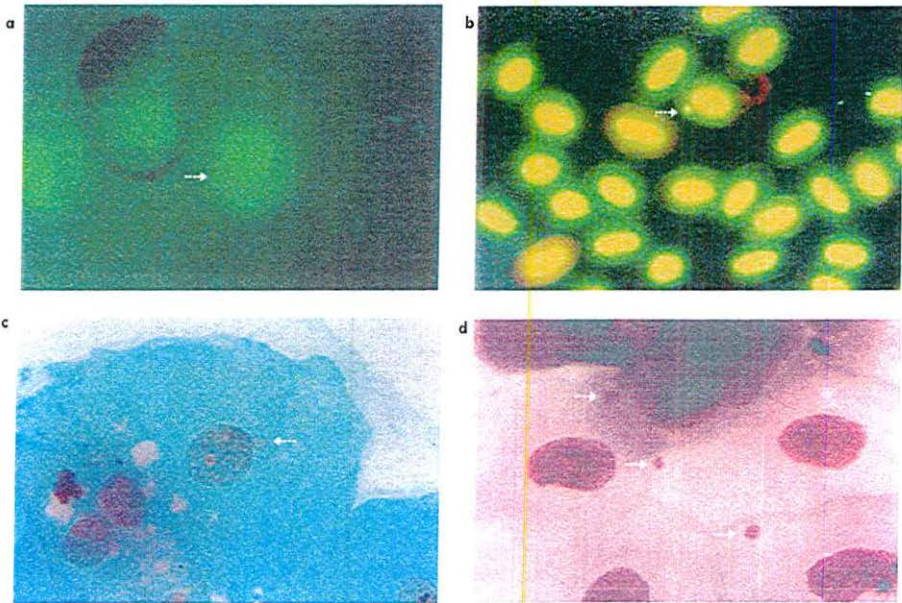


Figura 3. Células micronucleadas en diferentes tejidos. a) células de vagina de rata en proestro (tinción naranja de acridina); b) eritrocitos de sangre periférica de perico (tinción naranja de acridina); c) mucosa bucal de humano (tinción orceína); d) células de muda de *Ambystoma* (tinción grifols).

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, carcinógenos ambientales y ocupacionales ^{26,27,29}, pudiéndose aplicar en cualquier lugar sin las limitaciones económicas que se pudieran tener al utilizar pruebas muy sofisticadas y por ende, muy caras ³⁰.

✧ *Eritrocitos en mamíferos.*

Los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) son uno de los elementos de la sangre periférica de los organismos ³¹. 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 ^{32,33}. En frotis teñidos se observan como corpúsculos circulares con borde liso ^{32,33,34,35}. 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). El eritrocito normal tiene una longevidad limitada en la circulación, de 120 ± 20 días ^{32,34,35}.

El eritrocito de los mamíferos carece de núcleo, a diferencia de todos los demás vertebrados que tienen glóbulos rojos nucleados. Las formas de los eritrocitos, dependiendo de la especie, pueden ir desde bicóncavos hasta elípticos ³⁵ (ver figura 4).

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 ³⁶.

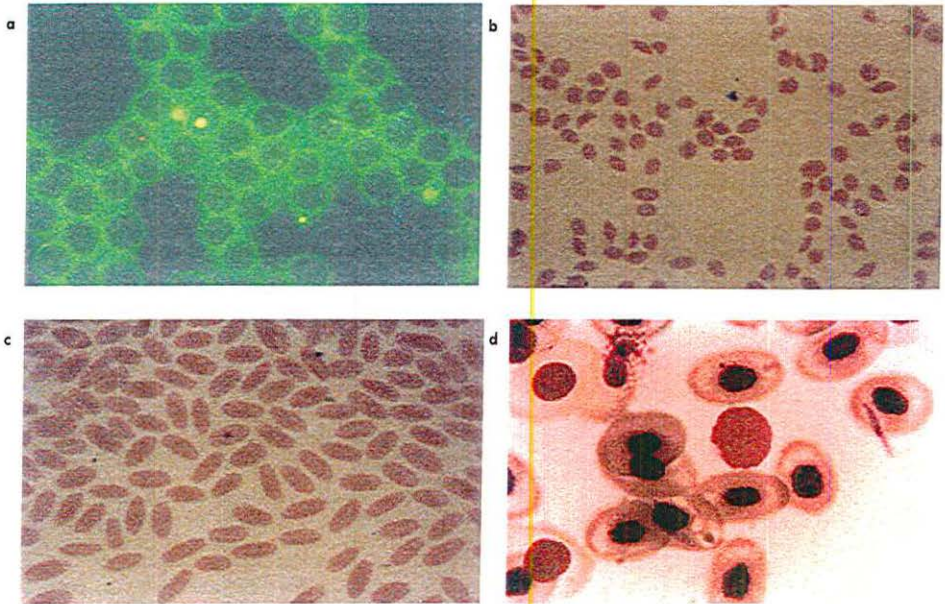


Figura 4. Eritrocitos en diferentes especies (tinción wright y giemsa). a) delfín (*Tursiops truncatus*); b) venado temazate (*Tamazate americana*); c) llama (*Lama glama*); d) sapo (*Bufo horribilis*)

En el estudio de MN 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 periodos de exposición por mayor tiempo o cuando la especie estudiada no presenta de manera normal EPC³⁰. 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 giemsa¹² o de color rojo con

naranja de acridina ¹⁶, lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de periodos cortos de exposición (ver figura 5).

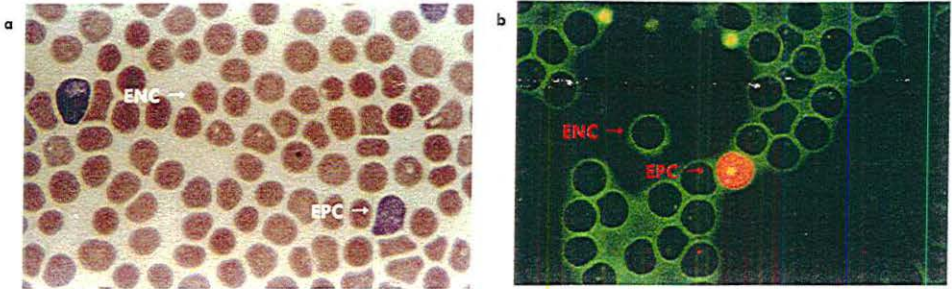


Figura 5. Eritrocitos normocromáticos y policromáticos de mamífero teñidos con: a) wright y giemsa; b) naranja de acridina (el EPC presenta MN).

En la formación del eritrocito, después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (en mamíferos, aproximadamente cinco horas después de completar la última mitosis), por razones no conocidas los MN permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es entonces cuando es posible visualizarlos ^{12,15}.

❖ **Micronúcleos y sistema reticuloendotelial.**

El sistema reticuloendotelial es el encargado de retirar a los eritrocitos con alteraciones, incluidos los eritrocitos micronucleados (EMN), entre otras anomalías presentes ^{21,37}. El bazo, 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, fagocitosis y eliminación por el sistema reticuloendotelial. 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 ^{33,35,38}, en la mayoría de las especies.

Existen especies que tienen alta eficiencia de su sistema reticuloendotelial para retirar los eritrocitos anormales, como es el caso del humano, ya que su número de EMN espontáneos (EMNe) en sangre periférica es prácticamente nulo, y éstos se evidencian cuando la persona tiene mal funcionamiento del bazo, o cuando ha sido esplenectomizado ^{19,39,40,41}, mientras que en otras especies se pueden observar estas estructuras en cualquier momento de su vida ⁴².

★ **Bioindicadores.**

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 EMNe 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 EMNe en buen número (6 o 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 incrementará ^{30,43}, 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 ⁴⁴, ratón ^{19,45} y hámster ¹², y otros no tan comunes como el gato ³⁰, ardilla ⁴⁶ y algunos primates ⁴⁷ o aves como los pollos, con las que se puede tener también un sistema *in vivo* mediante el estudio de su médula ósea ^{48,49}. En el caso de los anfibios cuyos eritrocitos son grandes, aproximadamente 30 μ a diferencia del

eritrocito de mamífero que mide 8 μ (ver figura 4a y 4b) y por lo tanto, 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*)⁵⁰, de igual manera, se han empleado los renacuajos de *Rana catesbeiana*⁵¹, además del primer anfibio usado como biomonitor *Pleurodeles waltl*⁵² y recientemente se ha propuesto realizar el ensayo de MN en células de muda de *Ambystoma sp.*²⁸. Un buen número de peces Teleosteos han sido propuestos, como la trucha *Oncorhynchus mykiss*, el pez japonés *Oryzias latipes*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*,⁵³ o *Umbra pygmaea*, éste último de reducida distribución geográfica⁵⁴.

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^{3,55,56}. 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^{55,57,58} o *Tradescantia* en la que se utiliza el polen^{37,59,60}.

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^{30,46}. 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 Mutagénesis, se han descrito especies con posibilidad de ser probadas como indicadores de agentes genotóxicos, principalmente micronucleogénicos, mediante el estudio de MN en eritrocitos de sangre periférica²² (ver cuadro 1), pero ninguna de estas especies podría ser utilizada en ambientes marinos.

Cuadro I.

Especies con mayor número de EMNe.

Especie (n)	Número de EMNe
Cerdo vietnamita (2)	95.5 EMNe
Mono Capuchino (4)	20.5 EMNe
Tigre de bengala (4)	20.5 EMNe
Puma (7)	18.5 EMNe
Hurón (2)	18.0 EMNe
Erizo (3)	15.4 EMNe
Ocelote (5)	13.5 EMNe
Lince (1)	10.8 EMNe
Mono Ardilla (3)	12.3 EMNe
Ardilla gris (3)	9.1 EMNe

n: número de especies muestreadas

EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos

★ **Delfín (*Tursiops truncatus*).**

El Orden de los Cétaceos está conformado por dos subórdenes, los Odontocetos y los Mysticetos, en total agrupan 13 Familias, 41 géneros y 79 especies ⁶¹. El Delfín común nariz de botella (*Tursiops truncatus*) pertenece al orden Odontocetos (ver cuadro II), que está conformado por 9 Familias y 35 géneros ⁶¹.

Cuadro II.

Clasificación taxonómica del delfín (*Tursiops Truncatus*).

Orden	→	Cetacea
Suborden	→	Odontoceti
Familia	→	Delfinidae
Género	→	<i>Tursiops</i>
Especie	→	<i>truncatus</i>

El delfín nariz de botella es, de los Odontocetos, el que presenta el morro más prominente con un cuerpo largo y robusto, aletas pectorales triangulares relativamente pequeñas, y un hocico corto marcado por una cresta que se encuentra con la frente ⁶¹. La coloración es gris oscuro en la parte dorsal y en la parte ventral es blanco sonrosado ⁶¹ (ver figura 6).



Figura 6. Delfín (*Tursiops truncatus*). a) aletas pectorales; b) morro; c) hocico; d) cresta

Los tamaños varían en rangos de longitud de 84 a 140 cm al nacer, con peso de 14 a 20 kg. El macho mide de 2.45 a 3.8 m, con peso alrededor de 500 kg, mientras que la hembra presenta una longitud de 2.4 a 3.7 m, con peso de 260 kg. El delfín machos viven alrededor de 40-45 años y la hembra alrededor de 50 años ⁶².

La madurez sexual es alcanzada entre los 2.2 a 2.6 m, que corresponde entre los 5 y 12 años de edad, y esto varía entre hembras y machos ⁶¹. El apareamiento y crianza varían geográficamente, pero usualmente ocurren en las estaciones de primavera y otoño; el periodo de gestación es de 1 año y las crías se amamantan hasta 18 meses ⁶¹. El ciclo reproductivo de las hembras es de 2 a 3 años ⁶¹. Para determinar el sexo se examina el vientre, tanto machos como hembras presentan hendidura genital (Figura 7a y 7b), y en el caso de las hembras, estas presentan pequeñas mamas visibles que se localizan a los lados de la hendidura genital (Figura 7b) ⁶¹.

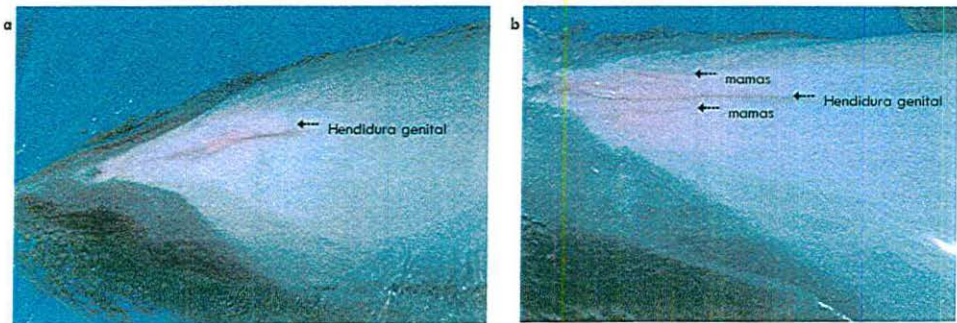


Figura 7. Sexado del delfín (*Tursiops truncatus*). a) macho; b) hembra

El delfín (*Tursiops truncatus*) presenta distribución y hábitat mundial, en aguas templadas y tropicales, usualmente en áreas costeras y en aguas de mar abierto, frecuentemente son encontrados a mitad del océano ⁶². Se alimentan de pequeños peces, así como de anguilas, bagres, calamares, camarones, entre otros ⁶². En cuanto a su estructura social, los delfines se pueden encontrar como individuos solitarios o en grupos, conformados desde 2 a más de 1,000 animales. Estudios de poblaciones de delfines, han revelado una estructura social fluida y al parecer los grupos cambian su composición con regularidad, sin embargo, existen patrones jerárquicos ⁶².

El delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) es el más conocido, ya que se encuentra en la mayoría de los acuarios por su gran capacidad de adaptación al cautiverio y facilidad en su adiestramiento para diferentes fines como sería la obtención de muestras biológicas para la realización de los estudios médicos que se realizan en el delfín (Figura 8a y 8b).

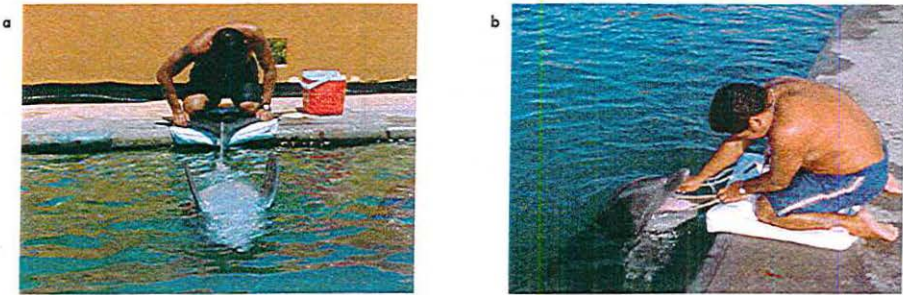


Figura 8. Adiestramiento del delfín (*Tursiops truncatus*) . a) toma de muestra de sangre; b) colocación de Sonda.

Por lo que en el presente trabajo se pretende caracterizar el número de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) con la finalidad de proponer un modelo marino útil como bioindicador de agentes genotóxicos, mediante la prueba de MN, con la ventaja de utilizar sólo una gota de sangre.

Planteamiento del problema

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 para determinar el potencial genotóxico de un compuesto, poder contar con diversas alternativas es vital. La prueba de MN tiene la ventaja de ser rápida, sencilla y económica, además de que la interpretación de los resultados no deja lugar a duda del daño producido.

Se conocen organismos bioindicadores que son de gran utilidad en el laboratorio, como el ratón, la rata, el hámster, peces y urodelos, sin embargo, no se cuenta con un modelo mamífero marino que dé la ventaja de trabajar con eritrocitos sin núcleo, que sirvan como centinelas en su medio, tanto en cautiverio como en vida silvestre, para detectar contaminación, particularmente de agentes micronucleogénicos.

Dada la falta de modelos marinos para la detección de agentes genotóxicos, se busca una especie que, de manera natural, sirva como bioindicador de contaminantes ambientales que afecten al ADN, mediante la formación de MN espontáneos, información que se da en forma directa, en su hábitat natural y con una sola gota de sangre.

Por lo anterior se plantea ¿Si el delfín (*Tursiops truncatus*), podría ser considerado como un modelo potencial para estudios de agentes genotóxicos mediante el conteo de EMNe de sangre periférica?

Justificación

En México las investigaciones que se han realizado en relación a delfines, se basan principalmente en su distribución y comportamiento. La falta de más estudios posiblemente se debe a la dificultad que presenta la observación de dichos organismos en su hábitat natural. Sin embargo, en los últimos años se han acondicionado muchos delfinarios en nuestro país, para mantener en cautividad esta especie, con el fin de conocer más sobre ellos.

Los delfines y demás organismos marinos se enfrentan ahora a graves problemas, como son los derrames de petróleo, contaminación radiactiva y desechos industriales que llegan al mar a través de los ríos, por lo que es importante la identificación de organismos que sirvan como indicadores biológicos de sustancias con efecto genotóxico, básicamente micronucleogénicos, información que podría darse en forma directa y fácil sólo con la utilización de una gota de sangre, por lo que la realización de la prueba de MN en el delfín (*Tursiops truncatus*) podría ser una nueva alternativa para el estudio de los medicamentos utilizados en los delfinarios, así como de la contaminación en su hábitat natural, mediante la determinación del daño al ADN, al utilizar la misma muestra que es obtenida para las diferentes pruebas de rutina que se les realizan cuando son muestreados.

Hipótesis

Debido a que el delfín (*Tursiops truncatus*) presenta EMNe en sangre periférica entonces es posible que sus valores sean mayores o iguales a 6, por lo cual puede ser considerado un organismo bioindicador de compuestos micronucleogénicos.

Objetivos

✧ General.

Caracterizar la presencia de EMNe en sangre periférica del delfín (*Tursiops truncatus*) para proponerlo como un potencial bioindicador de genotóxicos.

✧ Específicos.

1. Identificar los EMNe en sangre periférica en el delfín (*Tursiops truncatus*).
2. Establecer el valor basal de EMNe y la proporción de EPC en el delfín (*Tursiops truncatus*).
3. Determinar el valor de EMNe y la proporción de EPC de acuerdo al género del delfín (*Tursiops truncatus*) y establecer si existen diferencias entre géneros.
4. Correlacionar el número de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) con la edad.
5. Determinar si los valores de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) permanecen constantes en el tiempo.
6. Comparar el número de EMNe en sangre periférica en el delfín (*Tursiops truncatus*) entre los diferentes delphinarios.

Materiales y métodos

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 la colaboración de los delfinarios Delfiniti de México S. A. de C.V., Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero; CIMMA (Centro Internacional de mamíferos marinos) Guadalajara, Jalisco y Cici, Acapulco, Guerrero.

En el diagrama de flujo (ver figura 12, página 22) se presenta la metodología que se llevó a cabo y que a continuación se describe en detalle.

✦ *Colecta de Muestras.*

Se obtuvieron 48 muestras de sangre periférica de 12 delfines sanos (*Tursiops truncatus*), las cuales fueron tomadas mediante punción en la vena de la aleta caudal con equipo vacutainer (ver figura 9a y 9b) o una venoclisis de mariposa (ver figura 10). La obtención de las muestras fue la del día en que se tomaban muestras de sangre para realizar los diferentes estudios de gabinete que se llevan a cabo en los delfinarios y en los casos en que fue posible, se tomaron muestras del mismo delfin en diferentes tiempos.

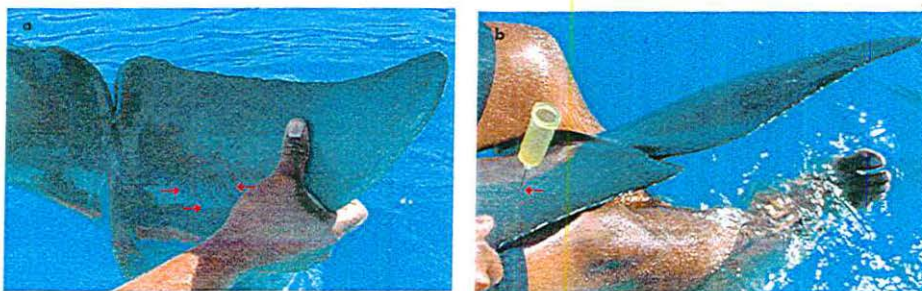


Figura 9. Toma de muestra de sangre periférica en el delfin. a) venas de la aleta caudal; b) punción con vacutainer.

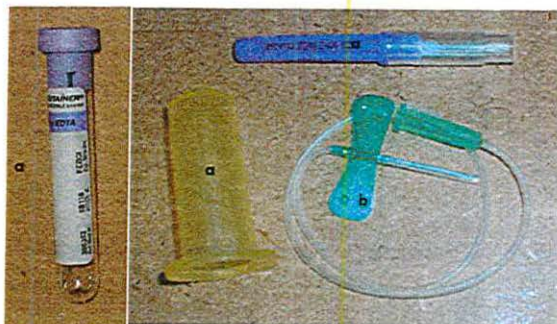


Figura 10. Materiales para la toma de la muestra. a) vacutainer (cuerpo, tubo receptor y aguja); b) venoclysis de mariposa.

✧ **Elaboración y análisis de las muestras.**

Se elaboraron 3 frotis por animal en portaobjetos limpios y marcados, se dejaron secar al aire, se fijaron en etanol absoluto por 10 min. Ya que en el delfín es la primera vez que se identificaban EMNe de sangre periférica, las laminillas fueron teñidas con naranja de acridina ²⁷ (ver anexo; apartado de preparación y análisis de las muestras), tinción específica para ácidos nucleicos ^{16,63} y dado que los MN están formados de ADN, estos se tiñen de color amarillo o verde brillante, mientras que el citoplasma se tiñe de verde opaco semitransparente (ver figura 11). Las laminillas fueron analizadas mediante microscopio de fluorescencia. De cada muestra, una se tiñó y las dos restantes se almacenaron como respaldo para ser utilizados sólo en caso necesario. Se contaron el número de EMNe en 10,000 eritrocitos y la proporción de EPC en 1,000 eritrocitos. Los valores de los individuos muestreados se promediaron y éste se presenta como el valor de la especie.

Las características tomadas en cuenta para considerar a una célula como normal fueron que presentara citoplasma intacto, poco o ningún empalme con células adyacentes (ver figura 10a); 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, que presentara un tamaño menor a un tercio del eritrocito, con perímetro liso, así como

intensidad de tinción, textura y plano focal similar al del núcleo de un leucocito (ver figura 11b y 11c).

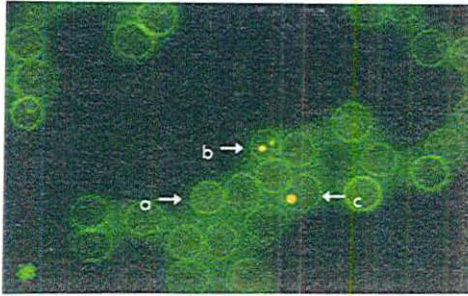


Figura 11. Frotis de sangre periférica de delfín (*Tursiops truncatus*) (tinción naranja de acridina). a) célula normal; b y c) células con MN.

❖ **Criterios de inclusión.**

Se incluyeron todas las muestras de delfines a las que se tuvo acceso.

❖ **Criterios de exclusión.**

Se excluyeron aquellas muestras que no fue posible analizar (por falta de material biológico, sucias o mal procesadas).

❖ **Tipo de estudio.**

Observacional

❖ **Análisis estadístico.**

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (DE). El Análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para determinar si existen diferencias en el número de EMNe y EPC entre delfines hembras y machos, así como para comparar el número de EMNe por delfinario, además se empleó la prueba de ajuste Bonferroni para múltiples comparaciones *post hoc*. La correlación de Pearson se utilizó para determinar si existía relación entre el número

de EMNe con la edad del delfin. Las pruebas estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS (v.11.0) para Windows®.

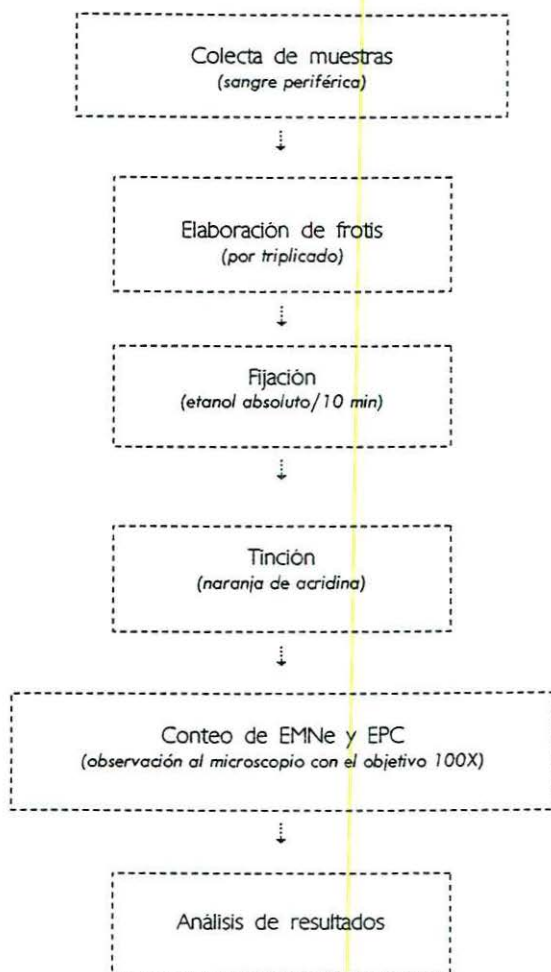


Figura 12. Diagrama de flujo.

Resultados

En la figura 13 se puede ver un EMN (a) y un EPC (b) del delfín (*Tursiops truncatus*), observados en el presente trabajo.

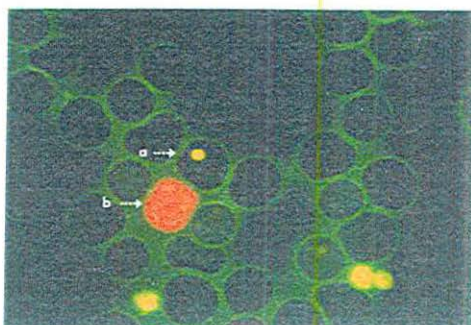


Figura 13. EMNe y EPC de sangre periférica en el delfín (*Tursiops truncatus*) (tinción naranja de acridina). a) célula con MN; b) EPC.

El número de delfines muestreados, sexo, edad y la procedencia se puede observar en el cuadro III. En total se analizaron 48 muestras de sangre periférica de 12 delfines (*Tursiops truncatus*), de los cuales 6 eran machos y 6 hembras, procedentes de tres diferentes delfinarios de la República Mexicana.

Los valores individuales de EMNe/10,000 eritrocitos y EPC/1,000 eritrocitos de cada una de las muestras obtenidas por delfín, así como el promedio y desviación estándar (DE) de EMNe/10,000 eritrocitos y de EPC /1,000 eritrocitos, en los casos en donde se pudo obtener más de una muestra del mismo animal en tiempos diferentes se muestran en el cuadro IV.

El promedio del valor basal de EMNe y EPC a partir de las 48 muestras fue 24.3 ± 6.1 EMN/10,000 eritrocitos, y 9.1 ± 5.5 EPC/1,000 eritrocitos (ver cuadro IV).

Al analizar las muestras por género, el promedio de EMNe en los 6 delfines hembra fue de $24.8 \pm 5.9/10,000$ eritrocitos, y el promedio de EPC fue de $8.7 \pm 5.3/1,000$ eritrocitos. En los 6 delfines machos, el promedio de EMNe fue de $23.4 \pm 6.5/10,000$ eritrocitos, y el promedio de EPC fue de $9.9 \pm 6.1/1,000$ eritrocitos (ver cuadro V), por lo que el número de EMNe y EPC entre delfines hembras y machos muestreados fueron estadísticamente iguales (ver gráfica 1). Por otro lado, en cuanto a la edad, no se encontró correlación entre el número de EMN y la edad del delfin (ver gráfica 2).

En el caso de los 10 animales de los que se pudo obtener muestras a diferentes tiempos (ver cuadro VII), los valores de EMNe se mantuvieron constantes, con ligeras variaciones dentro del promedio en los diferentes tiempos de muestreos, tanto en aquellos casos en donde se pudo obtener muestras con años de diferencia entre una muestra y otra (delfines 7, 8, 9), así como en muestreos mensuales durante el mismo año (delfines 1, 2, 10, 11, 12) (ver gráfica 3).

Al hacer un monitoreo preliminar, se comparó el número de EMNe del delfin entre los diferentes delfinarios muestreados (ver cuadro VI); el delfinario Delfiniti de México (Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero) presentó mayor número de EMNe, con diferencia estadísticamente significativa, (26.0 ± 5.9 EMNe/10,000 eritrocitos), comparado con los delfinarios CIMMA (Guadalajara, Jalisco) (19.5 ± 3.1 EMNe/10,000 eritrocitos) ($p < 0.05$) y Cici (Acapulco, Guerrero) (18.6 ± 3.5 EMNe/10,000 eritrocitos) ($p < 0.007$), mientras que entre los delfinarios CIMMA y Cici no se encontró diferencia estadísticamente significativa (ver gráfica 4).

Cuadro III.

Información general de los 12 delfines (*Tursiops truncatus*) muestreados.

Número de animal (<i>nombre</i>)	Sexo	Edad/años*	Procedencia
1. (<i>Jeny</i>)	H	8	CIMMA ^a
2. (<i>Mauricio</i>)	M	8	CIMMA ^a
3. (<i>Yum-ka</i>)	M	7	Delfinario Cici ^b
4. (<i>Maite</i>)	H	9	Delfinario Cici ^b
5. (<i>Chuy</i>)	M	7	Delfinario Cici ^b
6. (<i>Bayu</i>)	M	11	Delfinario Cici ^b
7. (<i>Marea</i>)	H	9	Delfiniti de México ^c
8. (<i>Kaly</i>)	H	8	Delfiniti de México ^c
9. (<i>Lluvia</i>)	H	10	Delfiniti de México ^c
10. (<i>Chocho</i>)	M	9	Delfiniti de México ^c
11. (<i>Brisa</i>)	H	37	Delfiniti de México ^c
12. (<i>Chame</i>)	M	5	Delfiniti de México ^c

H: hembra; M: macho; * edad estimada, ^a CIMMA: Centro internacional de mamíferos marinos, Guadalajara, Jalisco, México; ^b Acapulco, Guerrero, México; ^c Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero, México.

Cuadro IV.Número de EMNe y EPC de sangre periférica del delfín (*Tursiops truncatus*).

Animal	n	Conteo individual de EMNe/10,000 eritrocitos	EMNe/10,000 eritrocitos ^a	Conteo individual de EPC/1,000 eritrocitos ^a	EPC/1,000 eritrocitos
	3	14/21/21	18.6 ± 4.0	5/9/12	8.6 ± 3.5
2	3	18/20/23	20.3 ± 2.5	5/8/3	5.3 ± 2.5
3	2	15/25	20.0 ± 7.0	9/14	11.5 ± 3.5
4	1	16	16.0 ± 0.0	7	7.0 ± 0.0
5	2	18/19	18.5 ± 0.7	22/17	19.5 ± 3.5
6	1	19	19.0 ± 0.0	12	12.0 ± 0.0
7	8	19/22/22/23/24/25/26/36	24.6 ± 5.0	6/12/10/10/7/4/6/9	8.0 ± 2.6
8	7	18/22/22/24/25/26/29	23.7 ± 3.5	2/1/0/9/6/15/7	5.7 ± 5.2
9	7	25/27/29/29/32/36/43	31.5 ± 6.1	10/24/5/12/11/18/18	14.0 ± 6.3
10	6	19/23/27/31/33/36	28.1 ± 6.4	15/3/19/7	11.0 ± 7.3
11	5	20/22/22/24/26	22.8 ± 2.2	8/7/3	6.0 ± 2.6
12	3	16/22/34	24.0 ± 9.1	6/5/4	5.0 ± 1.0
Total	48		^a 24.3 ± 6.1		^b 9.1 ± 5.5

* Los valores están expresados como promedio ± DE y organizados de manera ascendente. Valores basales de ^a EMNe y de ^b EPC a partir de las 48 muestras. n: número de muestras; DE: Desviación estándar; EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos; EPC: eritrocitos policromáticos.

Cuadro V.

Comparación del número de EMNe y EPC de sangre periférica entre delfines (*Tursiops truncatus*) hembras y machos.

EMNe/10,000 eritrocitos		EPC/1,000 eritrocitos	
Hembra	Macho	Hembra	Macho
n=6	n=6	n=6	n=6
24.8 ± 5.9	23.4 ± 6.5	8.7 ± 5.3	9.9 ± 6.1
*NS		*NS	

Los valores están expresados como promedio ± DE. n: número de animales muestreados; DE: Desviación estándar; EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos; EPC: eritrocitos policromáticos; * Análisis de varianza (ANOVA).

Cuadro VI.

Comparación del número de EMNe del delfin (*Tursiops truncatus*) entre los diferentes delfinarios.

Delfinito de México (Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero)	CIMMA (Guadalajara, Jalisco)	Delfinario Cici (Acapulco, Guerrero)
n=36	n=6	n=6
26.0 ± 5.9	19.5 ± 3.1	18.6 ± 53.5
** ^a p<0.05	* ^c NS	* ^c NS
* ^b p<0.007		

Los valores están expresados en promedio ± DE. EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos; n: número de muestras analizadas; DE: Desviación estándar. Comparaciones: ^a Delfinito de México vs CIMMA; ^b Delfinito de México vs Delfinario Cici; ^c Delfinario CIMMA vs Delfinario Cici.

* Análisis de varianza (ANOVA).

Cuadro VII.Comparación del número de EMNe del delfín (*Tursiops truncatus*) en el tiempo.

Animal	n	Fecha de toma de muestra	EMNe/10,000 eritrocitos	Promedio \pm DE
1	3	Oct-2002	21	18.6 \pm 4.0
		Dic-2002	21	
		X	14	
2	3	Oct-2002	20	20.3 \pm 2.5
		Dic-2002	23	
		X	18	
3	2	Nov-2002	25	20.0 \pm 7.0
		X	15	
5	2	Nov-2002	19	18.5 \pm 0.7
		X	18	
7	8	Jun-2001	22	24.6 \pm 5.0
		Oct-2001	23	
		Mar-2003	19	
		Abr-2003	26	
		May-2003	22	
		Jun-2003	36	
		Jul-2003	24	
		Ago-2003	25	
8	7	Oct-2001	18	23.7 \pm 3.5
		Mar-2003	24	
		Abr-2003	22	
		May-2003	25	
		Jun-2003	26	
		Jul-2003	29	
		Ago-2003	22	

Los valores están expresados como promedio \pm DE. n: número de muestras; DE: Desviación estándar; EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos; sp.: especie; X: no se contó con información de la fecha de la toma de la muestra.

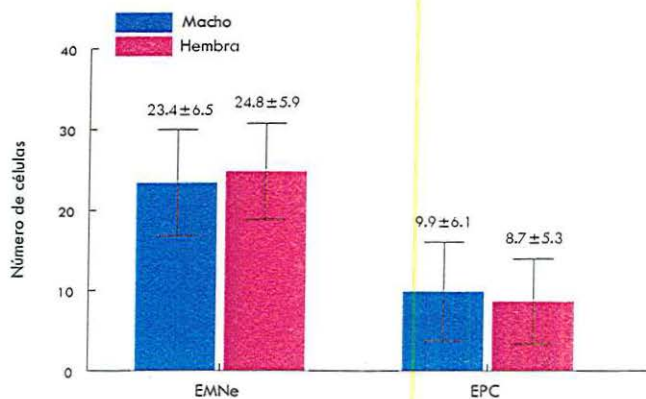
..continuación cuadro VII

Animal	n	Fecha de toma de muestra	EMNe/10,000 eritrocitos	Promedio \pm DE	
9	7	Oct-2001	43	31.5 \pm 6.1	
		Mar-2003	29		
		Abr-2003	25		
		May-2003	29		
		Jun-2003	27		
		Jul-2003	32		
		Ago-2003	36		
10	6	Mar-2003	27	28.1 \pm 6.4	
		Abr-2003	23		
		May-2003	31		
		Jun-2003	36		
		Jul-2003	33		
11	6	Ago-2003	19	22.8 \pm 2.2	
		Mar-2003	20		
		Abr-2003	22		
		May-2003	22		
		Jul-2003	24		
12	3	Ago-2003	26	24.0 \pm 9.1	
		Mar-2003	34		
		Abr-2003	16		
			Ago-2003	22	
<i>Promedio de EMNe de la especie</i>				\rightarrow 24.3 \pm 6.1	

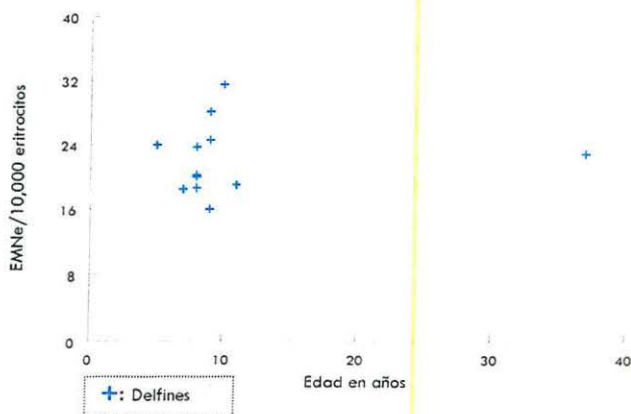
Los valores están expresados como promedio \pm DE. n: número de muestras; DE: Desviación estándar; EMNe: eritrocitos micronucleados espontáneos; sp.: especie; X: no se contó con información de la fecha de la toma de la muestra.

Gráfica 1.

Comparación del número de EMNe y EPC de sangre periférica entre delfines (*Tursiops truncatus*) hembras y machos.

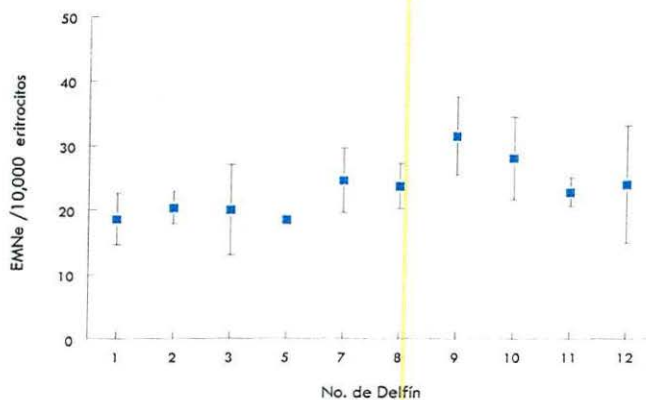
**Gráfica 2.**

Correlación entre el número de EMNe de sangre periférica y la edad del delfin (*Tursiops truncatus*).

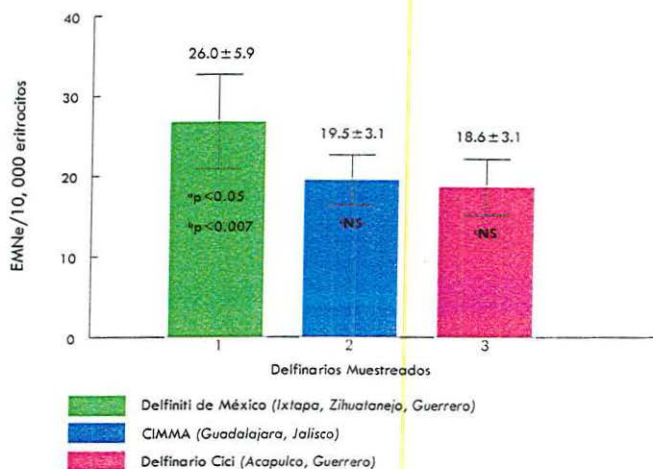


Gráfica 3.

Promedio \pm DE del número de EMNe en los 10 delfines (*Tursiops truncatus*) con más de una muestra.

**Gráfica 4.**

Comparación del número de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) entre los diferentes delfinarios.



Comparaciones : ^a delfinario 1 vs 2; ^b delfinario 1 vs 3; ^c delfinario 2 vs 3

Discusión

Para realizar monitoreos de agentes genotóxicos, mediante el ensayo de MN dentro de una población o entre diferentes poblaciones, se requiere conocer primero si la especie a utilizar presenta EMNe 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.

El valor basal de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) obtenido en el presente trabajo a partir de las 48 muestras fue $24.3 \pm 6.1/10,000$ eritrocitos. Si se compara el valor de EMNe de este mamífero marino obtenido en el presente, con las especies que han presentado los valores más altos de EMNe muestreadas en el Laboratorio de Mutagénesis como ²²: el cerdo vietnamita (*Sus scrofa*: 95.5 ± 0.7), tigre de bengala (*Panthera tigris*: 20.5 ± 2.9), mono capuchino (*Cebus sp.*: 20.5 ± 4.2), puma (*Puma concolor*: 18.5 ± 0.7), hurón (*Mustela putorius*: 18.0 ± 3.6), erizo (*Erinaceus europaeus*: 15.4 ± 6.7), ocelote (*Felis pardalis*: 13.5), mono ardilla (*Saimiri sciureus*: 12.3 ± 6.6), lince (*Lynx rufus*: 10.8 ± 9.6), ardilla gris (*Sciurus aureogaster*: 9.1 ± 5.6), se puede observar que el número de EMNe del delfín se encuentra entre los valores altos. Se conoce que algunos mamíferos sanos no presentan EPC en sangre periférica como la vaca, caballo, cabra y burro, otras especies, como el gato, pueden presentar valores bajos de EPC, de 0 a 1.10% ³⁵, este no fue el caso del delfín, ya que su promedio de EPC en sangre periférica fue de $9.1 \pm 5.5/1,000$ eritrocitos. Por tanto, la presencia de EMNe y EPC en el delfín (*Tursiops truncatus*) permitiría la evaluación del daño acumulado mediante el conteo de EMN, así como el efecto citotóxico del compuesto a probar por medio de la proporción de EPC, dado que para que se puedan observar EMN, es necesario que la célula se divida y de esta manera el delfín (*Tursiops truncatus*) podría

ser considerado un mamífero marino potencial centinela para la evaluación de agentes genotóxicos por medio de la prueba de MN, tanto en cautiverio como en vida silvestre.

En el delfín ya se habían identificado MN en cultivos de linfocitos⁶⁴, sin embargo, en el presente trabajo se identificó la presencia de EMNe en eritrocitos de sangre periférica. El realizar la prueba de MN en sangre periférica es una alternativa que ofrece resultados claros y contundentes, con la posibilidad de trabajar *in vivo* y la necesidad de sólo una gota de sangre para la realización de los frotis^{11,15,42,46}, lo que la hace una manera fácil y barata de trabajar este ensayo, ya que se puede aplicar en cualquier lugar, no se requieren cultivos de células y por lo tanto, infraestructura costosa, que pudieran limitar la realización del ensayo, además de ser rápida en cuanto a la obtención de resultados y económica, ya que sólo se requiere de colorantes para la tinción y un microscopio para el análisis de la muestras y sin la necesidad de sacrificar al animal para poder tomar la muestra.

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^{65,66}. En el presente trabajo todos los animales muestreados presentaban buen estado de salud al momento de la toma de la muestra y no existía antecedente de enfermedades mayores (información obtenida a partir de la revisión de los expedientes de cada uno de los animales muestreados así como de los médicos veterinarios a cargo de los delfinarios). Respecto al género, el número de EMNe en la comparación entre hembras ($24.8 \pm 5.9/10,000$ eritrocitos) y machos ($23.0 \pm 6.5/10,000$ eritrocitos), estos fueron estadísticamente similares en los animales muestreados, sin embargo, en la literatura se ha descrito que pueden existir diferencias en el número de EMNe entre géneros^{67,68,69} y esta variabilidad puede ser atribuible a diferencias enzimáticas y/o hormonales encontradas entre machos y hembras^{68,70}, así pues, en el caso particular del delfín, el sexo no es un factor que influya en la frecuencia de EMNe, por lo que en futuros trabajos en donde se pretenda utilizar a esta especie para la

realización del ensayo de MN se podrían utilizar tanto hembras como machos, sin el temor de que esta variable pudiera influir en los resultados. Asimismo, ha sido descrito que la edad puede influenciar el número de EMNe ^{70,41} y la presencia de estos depende de la especie ^{42,46}, ya que en algunos trabajos con pacientes esplenectomizados adultos y niños, se encontraron diferencias en el número de EMN en sangre periférica y células micronucleadas de mucosa bucal, con valores mayores en adultos con respecto a niños ⁴¹. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores, quienes han encontrado que en mamíferos el daño a nivel cromosómico incrementa en función de la edad, y que esto pudiera estar relacionado con daño acumulado al ADN y pérdida de eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN ^{66,71,72}. Por otro lado, se ha encontrado más bajo número de intercambio de cromátidas hermanas en niños que en adultos ^{73,74}; estudios en roedores apoyan lo anterior, pues se ha encontrado que la frecuencia de espermátides micronucleadas es más alta en ratones y hámster viejos cuando se compararon con controles jóvenes ^{75,76}, sin embargo, en el presente trabajo no se observó correlación entre el número de EMNe y la edad del delfín, esto muy probablemente debido a que casi todos los delfines muestreados eran adultos jóvenes que se encontraban en un rango de 5-11 años de edad, a excepción de un solo animal viejo, con 37 años de edad, esta diferencia pudiera manifestarse probablemente si se contara con muestras suficientes de delfines de diferentes edades, lo que permitiría concluir con mayor certeza si existe o no correlación entre el número de EMNe del delfín con la edad.

De los 12 delfines muestreados, en el caso de 10 animales se pudo obtener más de una muestra de sangre periférica a diferentes tiempos, esto da idea de cómo se comporta el número de EMNe en el tiempo. Con estas muestras se puede observar que no hay variaciones importantes entre los valores de EMNe por animal, manteniéndose en rangos del promedio del valor basal de la especie, lo cual es otro punto a favor, ya que los valores de EMNe en el delfín permanecen constantes en el tiempo, característica ideal para que

esta especie sea utilizada como posible bioindicador natural de agentes genotóxicos, principalmente micronucleogénicos, pues se puede tener la certeza de que los valores no variarán "espontáneamente", como es el caso de niños y adultos esplenectomizados, que una vez retirado el bazo los EMNe se evidencian en sangre periférica (niño: 14.5 ± 9.7 EMNe/10,000 eritrocitos; adulto: 29.1 ± 7.1 EMN/10,000 eritrocitos), y dicho valor basal se mantiene constante ^{41,43}. Por otro lado, en el Laboratorio de Mutagénesis se ha tenido la oportunidad de muestrear más de 150 especies para seleccionar aquellas con el mayor número de EMNe y con posibilidades de ser utilizadas como bioindicadores de genotóxicos micronucleogénicos; a partir de esta base de datos, el gato y la ardilla fueron probados obteniéndose en ambos casos resultados positivos, ya que el valor basal de EMNe en ambas especies aumentó significativamente después de ser expuestos a un genotóxico micronucleogénico conocido ^{30,46}. Con base en lo antes expuesto, se puede hipotetizar que si el delfin estuviera expuesto a un agente micronucleogénico en su medio, el número de EMNe incrementaría.

A manera de realizar un monitoreo preliminar, se comparó el número promedio de EMNe del delfin entre los diferentes delfinarios muestreados, y se observó que las muestras procedentes del delfinario Delfiniti de México (Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero) mostraron números significativamente mayores de EMNe comparados con los delfinarios CIMMA (Guadalajara, Jalisco) y Cici (Acapulco, Guerrero), los que presentaron similitud en su número de EMNe. Para tratar de explicar estas diferencias se revisaron revisamos las condiciones de los diferentes delfinarios, como alimentación, agua y otros parámetros escritos en los expedientes de cada uno de los delfines para conocer el historial de salud de los animales, así como determinar enfermedades, medicamentos o conocer si existía alguna predisposición a enfermedad en los delfines de un delfinario en particular. En cuanto a la salud de los delfines, como se menciono, ninguno de ellos había presentado enfermedades mayores y éstos se encontraban saludables al momento de la toma de las muestras. Por otro lado, en

cuanto a las condiciones de los delfinarios se encontró que la única característica, aparentemente diferente, era la procedencia del agua con que se llenan los estanques, en el caso del delfinario CIMMA, éste filtra y prepara el agua de uso común para darle las condiciones adecuadas que requiere el delfín, mientras que los delfinarios Delfiniti (Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero) y Cici (Acapulco, Guerrero) llenan los estanques directamente con agua de mar filtrada. A partir de esta diferencia se podría lucubrar que el agua de mar con que se llenan los estanques de los delfines, podría contener compuestos genotóxicos y esta podría ser la causa de las diferencias encontradas entre los delfinarios, ya que se ha descrito que en los ambientes marinos existen compuestos tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), organoclorados (OCs) y metales pesados ⁷⁷, que causan daño al ADN ^{48,78,79,80} y cáncer ⁸¹. Si bien, si se considera esta posibilidad como un hecho, aun así se esperaría que las aguas del puerto de Acapulco fueran las más contaminadas, por lo que habría que conocer más a fondo aspectos como el origen de las corrientes marinas y si estas provienen de lugares contaminados. Por tanto, la presencia de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*) podría ser a la vez una herramienta útil para determinar daño al ADN, así como ser utilizada para monitorear el hábitat de los animales y compararlos con diferentes poblaciones de delfines en cautiverio o de vida silvestre.

El daño al ADN juega un papel importante en el desarrollo del cáncer y puede ser un factor de riesgo para teratogénesis y enfermedades genéticas ^{71,78}. Dado que la presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes. Además, la prueba de MN no deja lugar a duda del daño producido en el ADN, ya que es claro que los MN incrementan cuando los organismos son expuestos a genotóxicos con acción micronucleogénica ^{27,30,46}. Esta prueba se ha propuesto para monitorear exposiciones a compuestos genotóxicos en el hábitat natural de peces, invertebrados, mamíferos terrestres de vida silvestre ^{21,22,53,82,83}, pero hasta hoy no se había

propuesto a ningún mamífero marino como posible bioindicador de agentes micronucleogénicos en su hábitat, ya sea natural o en cautiverio, por su alto número de EMNe en sangre periférica. El delfín pertenece al Orden de los Cetáceos y en general este grupo de animales ha mostrado posibilidades de funcionar como bioindicador en varias de sus especies debido a la presencia de MN en linfocitos de sangre periférica ⁶⁴, aunque definitivamente en su mayoría son organismos difíciles de manejar en vida silvestre, pero si el objetivo es realizar monitoreos en animales de cautiverio, las cosas se ven diferentes, ya que entonces se cuenta con una herramienta adicional para detectar de exposición a genotóxicos. El delfín (*Tursiops truncatus*) es un mamífero marino por lo que sus eritrocitos son anucleados, característica que facilita la observación de los MN en el citoplasma de la célula. Por otro lado, la muestra de sangre puede ser obtenida fácilmente en delfines de cautiverio, ya que presentan la mejor disposición al entrenamiento de actividades, este entrenamiento se basa en un sistema condicionado, esto quiere decir que al enviarlo a realizar un ejercicio, a cambio recibirá un estímulo positivo (comida, caricias), motivándolo así a continuar con otro tipo de actividades cada vez más complicadas, que pueden ser igualmente para fines médicos y científicos ⁶², por tanto la toma de la muestra no llega a ser un problema.

El delfín cumple con la característica de presentar gran cantidad de EMNe espontáneos, ya que su sistema reticuloendotelial no es tan eficiente para retirarlos de la circulación y como consecuencia se pueden observar variaciones en su número en sangre periférica como resultado de su acumulación, lo que hace que aquellos organismos con muchos EMNe sean buenos candidatos a ser bioindicadores de agentes genotóxicos micronucleogénicos.

Una ventaja más que da el trabajar la prueba de MN con especies que por su naturaleza presentan EMN espontáneos es que se tendrían más alternativas para descartar falsos positivos o negativos, ya que algunos compuestos pueden ser genotóxicos para algunas especies pero no para otras, los que se conocen como compuestos especie-específicos.

La importancia de este tipo de trabajos radica en ofrecer más alternativas para determinar con mayor exactitud los problemas que pueden surgir en las especies que sean susceptibles a los compuestos de desconocida genotoxicidad de acuerdo a la especie y permiten tener conciencia de que los animales también son susceptibles a contaminantes y que se deberá ser más consciente del daño que a ellos se les produce.

Como se mencionó anteriormente, en el delfín (*Tursiops truncatus*) ya se habían identificado MN en linfocitos de sangre periférica ⁶⁴ pero no se había caracterizado la presencia de EMNe en sangre periférica, por lo que la propuesta del presente es dar a conocer su potencial como centinela de su medio ambiente, tanto en cautiverio como en vida silvestre, con la ventaja de que el ensayo de MN es sencillo, económico y rápido y que sólo se requiere una gota de sangre, colorantes y un microscopio para su realización, por lo que es factible implementar esta prueba, por ejemplo, en los diferentes acuarios de nuestro país, pudiéndose sumar sin ningún problema a las demás pruebas de rutina que se les realizan a los animales, lo que da la opción de detectar algunos agentes contaminantes antes de que éstos pongan en peligro la sobrevivencia de las especies ^{21,22}.

Conclusiones

- El delfín (*Tursiops truncatus*) presenta EMNe en sangre periférica, con valor basal promedio de $24.3 \pm 6.1/10,000$ eritrocitos y de EPC de $9.1 \pm 5.5/1,000$ eritrocitos.
- El valor de EMNe en delfines hembras es de $24.8 \pm 5.9/10,000$ eritrocitos y de EPC es de $8.7 \pm 5.3/1,000$ eritrocitos, mientras que en machos el valor de EMNe es de $23.4 \pm 6.5/10,000$ eritrocitos y de EPC es de $9.9 \pm 6/1,000$ eritrocitos.
- No se encontraron diferencias significativas por género respecto al número de EMNe en el delfín (*Tursiops truncatus*), por lo que no es una variable que interfiera en el valor de EMNe.
- No se encontró correlación entre la edad y el número de EMNe.
- Los valores de EMNe en el delfín permanecen constantes en el tiempo, característica ideal para que esta especie sea utilizada como posible bioindicador natural de agentes genotóxicos micronucleogénicos.
- No se pudo determinar el porqué de la diferencia en el número de EMNe entre los delfinarios muestreados, pero las diferencias significativas nos permiten suponer que algún contaminante ambiental podría ser el responsable.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el delfín (*Tursiops truncatus*) es un potencial centinela marino para monitorear su ambiente en la evaluación de agentes genotóxicos por medio de la prueba de MN en eritrocitos de sangre periférica, tanto en cautiverio como en vida silvestre, con sólo una gota de su sangre.

Bibliografía

1. SEMARNAP. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural. 1997-2000 México. 1997, SEMARNAP-INE, 17-24, 80.
2. 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.
3. Rodríguez-Ariza A, Abril N, Navas JJ, 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.
4. Plewa MJ, Gentile JM. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En Hollander A. *Series Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection.* Plenum Press. New York. 1982; vol. VI: 401-420.
5. Luck E. *Conservación química de los alimentos.* Ed. Acribia. España. 1977; 243.
6. 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 1985; 12:113-128.
7. 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 1985; 12:69-73.
8. Kier LD. The *Salmonella typhimurium*/mammalian-microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1986; 168:69-240.
9. Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutat Res.* 1985; 147:65-78.
10. Álvarez-Moya C. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *Tradescantia*. Tesis de Grado, Doctorado en Ciencias de la Salud Orientación Biomédicas. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 1998.
11. 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.
12. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutat Res.* 1983; 123:61-118.
13. 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 reassessment. *Clin Lab Hematol.* 1990; 12:269-275.

14. McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de Hematologia. Ed. Médica Panamericana. 5ª ed. Madrid. 1998; 8, 18.
15. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975; 31:9-15.
16. 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.
17. Yamamoto K, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* 1980; 71:127-131.
18. Odagiri Y, Zhang J, Uchida H, Kawamura K, Adachi S, Takemoto K. Predominant induction of kinetochore-containing micronuclei by extracts of diesel exhaust particulates in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 1994; 23:45-50.
19. 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.
20. Zúñiga G, Torres-Bugarin O, Ramirez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res.* 1996; 369:123-127.
21. Zúñiga-González G, Torres-Bugarin O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Pérez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, 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.
22. Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ Mol Mutagen.* 1987; 9:37-58.
23. 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.
24. Schmezer P, Pool BL, Lefevre PA, Callander RD, Ratpan F, Tinwell H, Ashby J. Assay-specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver *in vivo*. *Environ Mol Mutagen.* 1990; 15:190-197.
25. Russo A, Levis AG. Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents: Induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 19:125-131.
26. Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Pérez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, Gutiérrez-Franco A, 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.* 2003; 539:177-186.
27. Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Álvarez-Moya C, Torres-Bugarin

- O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 42:306-310.
28. Zamora-Perez A, Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Bugarin 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.
 29. Torres-Bugarin O, De Anda-Casillas A, Ramirez-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.
 30. Zúñiga-González G, Ramirez-Muñoz MP, Torres-Bugarin O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Pérez 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; 413:187-189.
 31. Dorland. Diccionario Médico de Bolsillo. Ed. Interamericana-McGraw Hill. 24ª ed. España. 1993; 269.
 32. Hillman RS, Finch CA, Boggs DR, Winkelstein A, Harker LA. Manual de Hematología. Ed. Manual Moderno. 4ª ed. México. 1977; 15.
 33. Hillman RS, Finch CA. El Eritrocito. Ed. Manual Moderno. 5ª ed. México. 1987; 18-23.
 34. McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de Hematología. Ed. Médica Panamericana. 5ª ed. Madrid. 1998; 8,18.
 35. Schalm OW. Hematología Veterinaria. Ed. UTEHA. 1ª ed. México. 1964; 216-234.
 36. Reagan WJ, Sanders TG, De Nicola DB. Hematología Veterinaria-Atlas de especies domésticas. Ed. Harcourt Brace. Madrid. 1999; 5-7,13.
 37. Zúñiga G. Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotóxicos mediante el conteo de micronúcleos. Tesis de Grado, Doctorado en Ciencias de la Salud Orientación Biomédicas. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 1996.
 38. Novales CX, Amato MJ. Sistema linfhemático. Ed. Limusa. 1ª ed. 1993; 57-124,160-165.
 39. Griffiths JF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WI. Genética. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 5ª ed. Madrid. 1993; 569-570.
 40. Tolbert P, Shy C, Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears methods development. *Mutat Res.* 1992; 271:69-77.
 41. Torres-Bugarin 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; 4:212-217.
 42. Zúñiga-González G, Torres-Bugarin 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.* 2001; 494:161-167.
43. Zúñiga G, Torres-Bugarin O, Ramirez-Muñoz MP, Delgado-Lamas JL, De Loza-Saldaña R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res.* 1996; 361:107-112.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Zúñiga-González G, Torres-Bugarin 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.* 2001b; 37:173-177.
 47. Choy WN, Henika PR, Willhite CC, Tarantal AF. Incorporation of a micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-selenomethionine in non human primates. *Environ Mol Mutagen.* 1993; 21:73-80.
 48. 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
 49. 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.
 50. Rudek Z, Rozek M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* y *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutat Res.* 1992; 298:25-29.
 51. 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.
 52. 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.
 53. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995; 343:121-135.
 54. 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.

55. Burgeot T, His E, Galgani F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res.* 1995; 342:125-140.
56. 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.
57. 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.
58. Ma TH, Xu Z, Xu Ch, McConell H, Valtierra E, Arreola G, Zhang H. The improved Allium/Micia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res.* 1995; 334:185-195.
59. 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.
60. 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.
61. Vaughan TA. Mammalogy. Books and colle. 4th ed. U.S.A. 2000; 226-427.
62. Reeves RR, Stewart B, Clapham PJ, Powel JA. Guide to marine mammals of the world. Chanticleer press edition, New York. 2000; 326-361.
63. Hayashi M, Morita T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescents staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 120:241-247.
64. Gauthier JM, Dubeau H, Rassart E, Jarman WM, Wells RS. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutat Res.* 1999; 444:427-439.
65. 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.
66. Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res.* 1998; 404:155-165.
67. Ishikawa H, Tian Y, Yamauchi T. Influence of gender, age and lifestyle factors on micronuclei frequency in healthy Japanese populations. *Occup Health.* 2003; 45:179-181.
68. Meyne J, Legator MS. Sex-related differences in cytogenetic effects of benzene in the bone marrow of Swiss mice. *Environ Mutagen.* 1980; 2:43-50.
69. 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.
70. Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:23-36.

71. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 1996; 365:147-159.
72. King CM, Gillespie ES, McKenna PG, Barnett YA. An investigation of mutation as a function of age in humans. *Mutat Res.* 1994; 316:79-90.
73. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen.* 1998; 31:228-242.
74. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, Capurso A, Guanti G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res.* 2001; 498:159-167.
75. 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.
76. Allen JW, Collins BW, Setzer RW. Spermatid micronucleus analysis of ageing effects in hamster. *Mutat Res.* 1996; 316:261-266.
77. Martineau D, De Guise S, Fournier M, Shugart L, Girard C, Lagace A, Beland P. Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. Past, present and future. *Sci Total Environ.* 1994; 154:201-215.
78. Oshimura M, Barrett JC. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen.* 1986; 8:129-159.
79. Franchi E, Loprieno G, Ballardini M, Petrozzi L, Migliore L. Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutat Res.* 1994; 320:23-29.
80. Warshawsky D, Livingston GK, Fonouni-Fard M, LaDow K. Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 1995; 26:109-18.
81. Warshawsky D, Talaska G, Xue W, Schneider J. Comparative carcinogenicity, metabolism, mutagenicity, and DNA binding of 7H-dibenzo[c,g]carbazole and dibenz[a,j]acridine. *Crit Rev Toxicol.* 1996; 26:213-249.
82. De Flora S, Bagnasco M, Zanacchi P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean sea. *Mutat Res.* 1991; 258:285-320.
83. McBee K, Bickham JW, Brown KW, Donnelly KC. Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus* and *Sigmodon hispidus*) at a petrochemical waste disposal site: I. Standard karyology. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1987; 16:681-688.

Anexos

✧ **Glosario**

- ↳ **ADN.-** Abreviatura de ácido desoxirribonucleico, constituyente esencial de los cromosomas de núcleo celular.
- ↳ **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.
- ↳ **Aneuploidógeno.-** Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.
- ↳ **ARN.-** Abreviatura de 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 muestra de droga por comprobación de su efecto sobre un organismo vivo o un preparado aislado de órgano.
- ↳ **Bioindicador.-** Organismo utilizado para detectar algún tipo de contaminante.
- ↳ **Carcinógeno.-** Cualquier agente que produce cáncer.
- ↳ **Centrómero.-** Región especializada de un cromosoma en la que se enganchan las fibras del huso en la división celular. La localización del centrómero determina la forma del cromosoma durante la anafase de la división celular. También se conoce como constricción primaria.
- ↳ **Clastógeno.-** Agente capaz de ocasionar rupturas en el ADN.
- ↳ **Cromosoma.-** Cuerpo constituido por ADN incluido dentro de una trampa proteica; son los portadores de la información genética. Se hallan en el núcleo de la célula y pueden observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular.

- ↳ **Esplenectomía.**-Escisión o extirpación del bazo.
- ↳ **Genotóxico.**-Agente que afecta al ADN.
- ↳ **Micronúcleo.**- Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo, por lo que queda en el citoplasma celular .
- ↳ **Micronucleogénico.**-Agente formador de micronúcleos.
- ↳ **Morro.**-Parte de la cabeza de algunos animales donde están la boca y la nariz.
- ↳ **Mutación.**- Cambio permanente y heredable del material genético. Definido comúnmente como un cambio en un solo gen (mutación en un punto), aún cuando el término se usa también para designar un cambio en el número o disposición de los cromosomas.
- ↳ **Mutagénico.**- Agente capaz de inducir mutaciones.
- ↳ **Telofase.**- Periodo 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.

❖ **Preparación y análisis de las muestras.**

➤ **Preparación de las muestras de eritrocitos de sangre periférica.**

1. Las muestras se colectan y registran.
2. Se elaboran tres frotis de sangre por cada muestra. En caso de que la elaboración de los frotis no sea en fresco, es decir directamente, sino que se colectara para después realizarse los frotis, esta deberá ser almacenada en tubos con EDTA (con tapón morado).
3. Se dejan secar a temperatura ambiente.
4. Se fijan en etanol absoluto por 10 min. En caso de que no se vayan a analizar inmediatamente, estas pueden ser guardadas en cajas de almacenaje para protegerlas del polvo.
5. Se tiñen con naranja de acridina.
6. Se observan al microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x.
7. Se cuentan 10,000 eritrocitos por muestra.

➤ **Tinción con anaranjado de acridina.**

La tinción de las laminillas se realizó con anaranjado de acridina, 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 microscopía de fluorescencia, mientras que el citoplasma se tiñe de verde opaco semitransparente.

Se debe considerar 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.

➤ **Procedimiento 27.**

- 1 Se prepara un buffer de fosfatos, para lo cual se pesan 2.16 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) y 11.49 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Estas cantidades se disuelven en 1,000 ml de agua desmineralizada.
- 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.
- 9 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.

➤ **Lectura de las laminillas.**

Para la lectura de las laminillas, se toma una de la caja tapada, se le agregan unas 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 EMN en un total de 10,000 células.

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 (ver figura 11a); 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 tercio del eritrocito, que presentaran perímetro liso y redondo que sugiriera membrana (ver figura 11b), así como intensidad de tinción, textura y plano focal similar al del núcleo de un leucocito.