

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



**RELACION DEL NUMERO DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS
DE SANGRE PERIFERICA DE LA ARDILLA GRIS *Sciurus*
aureogaster CON EL PESO EDAD Y SEXO**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

P.M.V.Z. MARIO LUNA AGUIRRE

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, AGOSTO 2002.

Este trabajo se realizó en el

LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS

Centro de Investigación Biomédica de Occidente, C.I.B.O.

Instituto Mexicano del Seguro Social, I.M.S.S.

Presenta:

Mario Luna Aguirre

Bajo la Dirección de:

Biol. María Luisa Ramos Ibarra

La Asesoría de:

M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda

Colaboradores:

Biol. Ana Lourdes Zamora Perez

Dra. en C. Olivia Torres Bugarín

Dr. en C. Guillermo Zúñiga González

Agradecimientos:

A DIOS

Por permitirme llegar a este momento.

A MIS PADRES

Jaime Luna Hernández

Ma. del Refugio Aguirre González

Por todos los años de esfuerzo y formación humana que me han brindado.

A MIS HERMANOS

Jaime, Fanny y Liliana.

A MI ESPOSA E HIJO

Alma B. Sánchez R.

Mario Luna Sánchez

Por su ayuda, comprensión y apoyo constante.

A MI DIRECTOR DE TESIS

Biol. María Luisa Ramos

Por la conducción de este trabajo.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA MANERA U
OTRA AYUDARON A LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

RELACIÓN DEL NÚMERO DE ERITROCITOS
MICRONUCLEADOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE
LA ARDILLA GRIS *Sciurus aureogaster* CON EL
PESO-EDAD Y SEXO

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
Prueba de micronúcleos	2
Micronúcleos en sangre periférica	5
Biomonitores y su utilidad	8
Ardilla gris	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODO	20
Grupo de trabajo	20
Seguimiento de la frecuencia de eritrocitos micronucleados	21
Toma de muestras	21
Análisis de muestras	22
Criterios de inclusión	22
Criterios de exclusión	23
Definición de variables	23
Análisis estadístico	23

	Página
Diagrama de flujo	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
FIGURAS	
1. Formación de micronúcleos	2
2. Células micronucleadas en diferentes tejidos	3
3. Frotis de eritrocitos micronucleados en sangre periférica teñidos con naranja de acridina	22
CUADROS	
I. Orden de Roedores	11
II. Clasificación Taxonómica	12
GRÁFICA	
1. Promedio \pm desviación estándar de EMN en 11 ardillas muestreadas cada 15 días durante 6 meses.	26

RESUMEN

Es conocida la influencia de la edad en la variación del número de eritrocitos micronucleados (EMN) espontáneos en algunas especies incluyendo al humano, en el presente trabajo se demuestra, con la prueba de micronúcleos, cómo este factor influye en el número de EMN espontáneos de la ardilla gris *Sciurus aureogaster*. Debido a la dificultad de conocer la edad de cada uno de estos ejemplares, 11 animales fueron pesados en una balanza granataria para animales, al momento de tomar la muestra a su llegada al laboratorio, suponiendo que los animales más pesados eran de más edad y aquellos de menor peso eran los más jóvenes. El mayor número de EMN espontáneos se encontró en los animales más jóvenes mientras que los adultos presentaron significativamente menos EMN espontáneos. Por tal motivo, los animales fueron muestreados periódicamente por un lapso de 6 meses y los resultados obtenidos al ser comparados por análisis de regresión lineal y correlación de Pearson, demuestran que el número de EMN espontáneos sí disminuyó a través del tiempo, por lo que se concluye que el número de EMN espontáneos en la ardilla *Sciurus aureogaster* depende de la edad.

INTRODUCCIÓN

Cada día es creciente el número de compuestos de origen químico como de agentes físicos en el medio ambiente, capaces de inducir cambios en el material hereditario (Lewin 1993; Perera 1997; Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992; Salamanca, 1990). Este aumento drástico de contaminantes en el planeta, se ha asociado con el desarrollo creciente de procesos carcinogénicos, entre otros efectos nocivos para la salud (Perera, *et al.*, 1992).

Las teorías actuales tienden a considerar a la oncogénesis y la mutagénesis como expresiones diferentes de un mismo mecanismo básico, en el cual se presentan mutaciones sucesivas que desencadenan estos fenómenos. La mayor parte de los agentes oncogénicos pueden causar mutaciones y se ha demostrado, en condiciones de prueba apropiadas, que muchos mutágenos producen tumores (Bowman y Rand 1984).

Es bien conocido en toxicología genética que una sola prueba no es suficiente para determinar con exactitud o predecir con confiabilidad los efectos genotóxicos de una sustancia en el humano (Jena y Bhunya 1995). Por ello, se vuelve importante tener diversas alternativas de estudios para probar genotóxicos. La prueba de micronúcleos (MN) es una alternativa, ya que tiene la ventaja de ser rápida, sencilla, económica y además, no deja lugar a dudas del daño producido (Zúñiga 1996).

Prueba de Micronúcleos

Esta prueba *in vivo* sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas ya sean clastogénicos (que "rompen" cromosomas) o aneuploidogénicos (que dañan el huso mitótico), mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados (Heddle, *et al.*, 1978; Schmid 1975) que al quedar fuera del núcleo forman estas estructuras (Hart y Hartley, 1983; Heddle, *et al.*, 1983; Heddle, *et al.*, 1991; Yamamoto y Kikuchi 1980). Ambos efectos se pueden diferenciar por el tamaño de los MN (Figura 1) o por la presencia o ausencia de centrómero o cinetocoro (Afshari, *et al.*, 1994; Odagiri, *et al.*, 1994).

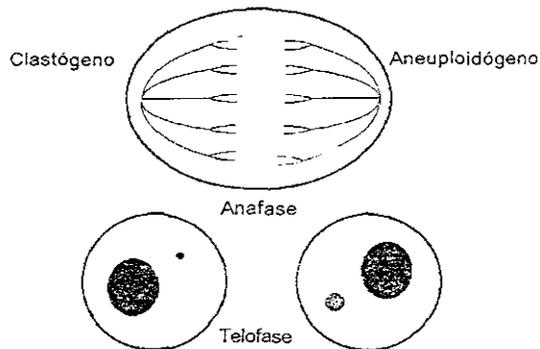


Figura 1. Formación de Micronúcleos.

La prueba de MN ha sido ampliamente aceptada y se realiza en diferentes especies y en gran variedad de tejidos con alta proliferación celular (Schmezer, *et al.*, 1990, Suzuki, *et al.*, 1993) (Figura 2).

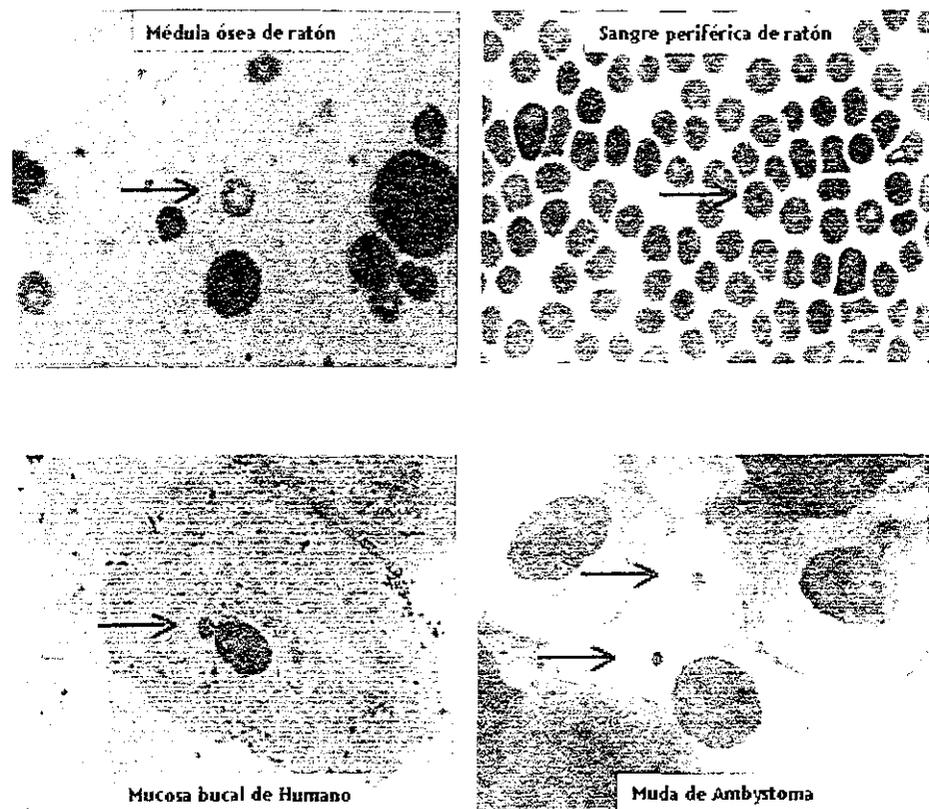


Figura 2. Células micronucleadas en diferentes tejidos.

El examen se puede realizar en mucosa bucal (Sarto, *et al.*, 1987; Torres-Bugarín, *et al.*, 1998), médula ósea (Schmid 1975), hepatocitos (Schmezer, *et al.*, 1990),

queratinocitos (Shuilin y Baker 1989), cultivo de linfocitos de sangre periférica (Heddle, *et al.*, 1978; Herrera, *et al.*, 1992), eritrocitos de sangre periférica (Tice, *et al.*, 1987; Torres-Bugarín, *et al.*, 1999; Zúñiga, *et al.*, 1996a, Zúñiga, *et al.*, 1996b) y en células germinales, en las que de existir daño genético, éste podría ser transmitido a la descendencia (Lähdetie 1983; Russo y Levis 1992) y de ahí la importancia de detectar estas alteraciones a tiempo.

La formación de los MN se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas. Los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de estos es transformada en uno o varios núcleos secundarios (Figura 1). Estos son mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de MN (Heddle, *et al.*, 1983).

El estudio de MN en sangre periférica se lleva a cabo en eritrocitos policromáticos (EPC) o jóvenes (para el caso de pruebas a exposición de 24 a 48 h) y en eritrocitos normocromáticos (ENC) o viejos (para pruebas a exposición crónica), en este último caso, también cuando la especie estudiada no presente de manera normal EPC en circulación, como es el caso de algunos felinos (Zúñiga-González, *et al.*, 1998).

En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly. Su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 1/20 a 1/5 (0.4 a 1.6 micras) del tamaño normal de un eritrocito (Corazza, *et al.*, 1990; Heddle, *et al.*, 1978; Schmid 1975).

Dentro de las ventajas de la técnica de MN se incluyen: facilidad, rapidez y la posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (Heddle, *et al.*, 1983; Sarto, *et al.*, 1987; Schmid 1975), con la posibilidad de que en futuras divisiones se pierdan.

Entre sus limitaciones, esta prueba no detecta agentes que no produzcan fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de fragmentos acéntricos, como translocaciones e inversiones) (Heddle, *et al.*, 1983; Jaylet, *et al.*, 1986), no es útil en células que contengan poco citoplasma, así como en poblaciones celulares que no se dividan (Heddle, *et al.*, 1983; Schmid 1975).

Micronúcleos en sangre periférica

Los precursores nucleados del eritrocito, llamados normoblastos, pierden su núcleo cuando pasan de la médula ósea al torrente circulatorio, debido a que los poros entre las células endoteliales de los sinusoides medulares tienen un diámetro menor que el núcleo esférico del normoblasto y como éste tiene que atravesar

dichos poros, la membrana y el citoplasma, que son deformables, logran pasar, pero el núcleo queda atrapado. La membrana se desgarró pero es reparada, mientras que el núcleo expulsado queda en la médula y es fagocitado por los macrófagos del estroma medular (Hillman, *et al.*, 1987; MacKey y MacGregor 1979; Novales y Amato 1993).

Después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (en mamíferos, aproximadamente 5 h después de completar la última mitosis), por razones desconocidas los MN permanecen en el citoplasma de los eritrocitos y entonces es posible visualizarlos (Hart y Hartley-Asp, 1983; Heddle *et al.*, 1983). En el humano, los MN son las anomalías más características después de la esplenectomía (Corazza, *et al.*, 1990; Pearson, *et al.*, 1978). Siendo parte del sistema reticuloendotelial, el bazo participa en la eliminación de los eritrocitos con anomalías; el control de calidad que ejerce el bazo sobre los eritrocitos se manifiesta por el aumento de formas anormales circulantes después de la esplenectomía, aquí se incluyen residuos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly), inclusiones de hemoglobina desnaturalizada (cuerpos de Heinz), siderocitos y células deformes o fragmentadas (Hillman, *et al.*, 1990).

En el humano, el número de MN espontáneos en eritrocitos de sangre periférica es cercano a cero en 10,000 eritrocitos. Sin embargo, cuando por alguna indicación del hematólogo un individuo es esplenectomizado éste de inmediato incrementa el número de MN de manera significativa y más aun si se expone a genotóxicos, tal

como medicamentos antineoplásicos; entonces, los MN se pueden observar en un frotis de sangre periférica (Schlegel, *et al.*, 1986; Zúñiga, *et al.*, 1996a).

Los MN pueden estar ligeramente incrementados en pacientes con asplenia congénita, atrofia del bazo, anemias hemolíticas, algunos casos de leucemia, anemia perniciosa, anemias megaloblásticas en remisión y en la asplenia funcional de la enfermedad drepanocítica (Mackey y MacGregor 1979; Novales y Amato 1993).

Por lo tanto, la condición de esplenectomía para algunos individuos y en aquellas especies en las que el bazo es el responsable de eliminar a los MN de la circulación, puede ser ventajoso, ya que se vuelve una herramienta más cuando se desea probar genotóxicos con ellos (Hayashi, *et al.*, 1992).

Algunos autores describen que la variabilidad de eritrocitos micronucleados (EMN) está influenciada por la edad, ya que en algunos trabajos con pacientes esplenectomizados, adultos y niños, que recibieron quimioterapia antineoplásica, se encontraron diferencias en el número de EMN en sangre periférica de adultos, con respecto a niños (Torres-Bugarín, *et al.*, 1999; Zúñiga, *et al.*, 1996a).

Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores, quienes han encontrado más bajo intercambio de cromátides hermanas en niños que en adultos (Wulf, *et al.*, 1996) y mientras que algunos estudios realizados en roedores apoyan lo anterior, en otros se ha encontrado que la frecuencia de espermátides

micronucleadas es más alta en ratones viejos y hámsters cuando se comparan con controles jóvenes (Allen, *et al.*, 1996; Lowe, *et al.*, 1995).

Asimismo, en la literatura se ha descrito que la sensibilidad para la inducción de MN respecto al sexo, puede ser atribuible a diferencias enzimáticas encontradas entre machos y hembras (Yusuke, *et al.*, 1991).

Biomonitores y su utilidad

Muchas de las sustancias tóxicas que a diario son arrojadas al medio ambiente, pueden ser detectadas con organismos vivos, los cuales nos pueden indicar el daño presente (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992). Los biomonitores ofrecen la ventaja de metabolizar sustancias químicas mutagénicas u oncogénicas que deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado. Por esta razón, cualquier prueba *in vitro* deberá de incluir un sistema de activación metabólica del compuesto original mediante una preparación de microsomas de hígado (Miguel, *et al.*, 1990).

Debido a la ventaja 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 los MN, estos organismos deberán responder formando MN en número suficiente como para que al exponerlos al probable agente genotóxico se observe incremento significativo en su número. El planteamiento es que si una

especie presenta eritrocitos micronucleados (EMN) espontáneos en buen número (6 o más en 10,000 eritrocitos) es debido a que el sistema reticuloendotelial no tiene un 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. Esto permitirá detectar genotóxicos micronucleogénicos mediante el estudio comparativo de los EMN de sangre periférica de estas especies (Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 1998; Zúñiga-González, *et al.*, 2000).

En la prueba de MN se pueden utilizar animales de laboratorio para los diferentes agentes a probar, de éstos los más utilizados son la rata (Trzos, *et al.*, 1978), el ratón (Hart y Hartley-Asp, 1983; Hayashi, 1990) y el hámster (Heddie, *et al.*, 1991). Recientemente se ha propuesto al gato (Zúñiga-González, *et al.*, 1998), así como organismos vertebrados no mamíferos como los anfibios, cuyos eritrocitos son muy grandes y por lo tanto facilitan la observación de MN (Jaylet, *et al.*, 1986), así como algunas aves (Bhunya y Jena 1992), peces (Al-Sabti y Metcalfe 1995) y plantas (Grant, *et al.*, 1992).

En el laboratorio de Mutagénesis, una de las líneas vigentes hasta el momento, es el identificar y seleccionar aquellas especies que presenten el mayor número de MN espontáneos en tejidos que sean viables de analizar, con el fin de proponerlos como probables biomonitores de daño genotóxico. Actualmente se tienen más de 100 especies diferentes de animales muestreados; dentro de las especies que

resultaron con valores más altos se encontraron (Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 1998; Zúñiga-González, *et al.*, 2000):

ORGANISMO	EMN/10,000 eritrocitos
Cerdo vietnamita	95.5
Ratón	21.4
Hurón	18.0
Gato siamés	11.0
Búho	10.6
Ardilla gris	9.1
Erizo	8.4
Cerdo	6.9

Sin embargo, el orden que ha presentado hasta el momento el mayor número de especies con EMN espontáneos elevados ha sido el de los roedores (Cuadro I) en la cual, de 7 especies muestreadas, la ardilla terrestre, cuyo y rata presentaron niveles muy bajos de éstos, mientras que el ratón, hámster, gerbo y ardilla gris presentaron alto número de EMN, sin embargo, de estos últimos, los tres primeros ya han sido estudiados como posibles modelos (Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 2000).

Cuadro I
Orden de Roedores

Especie	EMN/10,000 eritrocitos
Ratón balb-C (<i>Mus musculus</i>)	21.4 ± 6.5
Gerbo de Mongolia (<i>Meriones unguiculatus</i>)	9.4 ± 1.3
Ardilla gris (<i>Sciurus aureogaster</i>)	9.1 ± 5.6
Hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	6.3 ± 1.0
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	2.2 ± 0.7
Cuyo (<i>Cavia porcellus</i>)	0.3 ± 2.8
Ardilla (<i>Spermophilus variegatus</i>)	0.5 ± 0.8

En este cuadro se presentan los valores promedio y desviación estándar de eritrocitos micronucleados (EMN) espontáneos en sangre periférica de algunas especies de roedores.

Ardilla gris

La ardilla es un mamífero que pertenece al orden de los roedores, el cual cuenta con 29 Familias, 380 géneros y 1,687 especies; entre estas Familias se encuentra la Sciuridae con 30 especies. Las ardillas pertenecen a la Familia Sciuridae (Cuadro II), la cual se subdivide en dos subfamilias: la Sciuridae, que consta de 3 géneros e incluye a todas las especies terrestres y arborícolas (Encarta 1998).

Cuadro II
Clasificación Taxonómica

ARDILLA GRIS	
Clasificación Taxonómica	
ORDEN	Rodentia
SUBORDEN	Sciuromorpha
FAMILIA	Sciuridae
GÉNERO	<i>Sciurus</i>
SUBGÉNERO	<i>Sciurus</i>
ESPECIE	<i>aureogaster</i>

Las ardillas grises son mamíferos de mediano tamaño, de forma alargada, con una longitud total promedio de 49 cm, el dorso es de color gris con tonos café rojizos y cola de aproximadamente 23 cm. El peso de las ardillas grises es de 496.5 g, aunque llegan a pesar hasta 570 g. Las manos tienen cuatro dedos además son menos largas que las patas traseras, éstas tienen cinco dedos (Gismondi 1995; Mettler 1996).

Son de hábitos solitarios y sus actividades las realizan durante el día, desplazándose entre las ramas de los árboles, donde obtienen su alimento que se compone de brotes, conos y semillas. Gustan de los bosques de pino, pino-encino y mesófilo, aunque prefieren los entornos de bosque tropical, desde los espinosos semiáridos hasta los húmedos lluviosos (Gismondi 1995; Mettler 1996; Encarta 1998).

En cuanto a su reproducción y siendo animales solitarios, sólo en la época de celo se reúnen. El período de apareamiento puede efectuarse durante todo el año y se

ve influido por la limitación de alimento. Después de un período de gestación de 44 días aproximadamente, nace un promedio de 4 a 5 crías (Gismondi 1995).

El desarrollo de estas crías es muy lento y sólo después de un mes abren los ojos, aunque permanecen con la madre varios meses antes de alejarse, debido a este largo período de crianza las hembras no tienen más de un parto por año (Gismondi 1995).

La distribución de la ardilla gris en Hispanoamérica va desde el sur de Tamaulipas hasta Centroamérica y respecto a su distribución nacional, la ardilla gris se localiza a lo largo de los planos costeros de Tamaulipas y hacia el sur, hasta Tabasco y en el pacífico desde Chiapas hasta Nayarit (Mettler 1996). En la cuenca del Valle de México existen localidades donde hay registros de colecta de ardillas arborícolas, tal es el caso del Ajusco, el Desierto de los Leones, la ciudad de México, Amecameca, el volcán Iztaccíhuatl y en la ladera norte del volcán Popocatepetl (Encarta 1998).

Entre los depredadores naturales de las ardillas grises están el coyote, el lince, el gavián y el hombre (Encarta 1998).

Entonces, dado que la ardilla gris fue una de las especies seleccionadas por su número de EMN espontáneos en sangre periférica (Zúñiga-González, *et al.*, 2000) y como parte de su análisis con el fin de proponerla como biomonitor, se hace necesario determinar las variaciones que pudieran existir respecto al sexo y la

relación con el peso-edad de los organismos, a fin de conocer el comportamiento del número de EMN espontáneos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El monitoreo de la contaminación es indispensable, por lo que se vuelve importante tener nuevas alternativas sencillas, rápidas, económicas y confiables para su detección, razón por la que se pretende identificar organismos que sirvan como bioindicadores de genotóxicos mediante la prueba de MN.

Una vez detectado el organismo que de manera espontánea presente EMN, el siguiente paso será estudiar las ventajas y desventajas que nos puede ofrecer el modelo. Ya que se ha descrito en la literatura que en algunas especies el número de MN varía conforme avanza la edad del individuo y muchas veces esta respuesta se ve influenciada por el sexo (Allen, *et al.*, 1996; Bolognesi, *et al.*, 1997; Bolognesi, *et al.*, 1999; Lowe, *et al.*, 1995; Torres-Bugarín, *et al.*, 1999; Wulf, *et al.*, 1996; Yusuke, *et al.*, 1991; Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 2000). En este caso el aumento de MN en eritrocitos se atribuye a que probablemente el sistema reticuloendotelial es inmaduro, por lo que no puede retirar de la circulación éstas estructuras anormales, permitiendo así su visualización en sangre periférica. Por los antecedentes antes mencionados, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿El peso-edad y sexo influyen en la variación del número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster*?

JUSTIFICACIÓN

La prueba de MN tiene la ventaja de ser rápida, sencilla y económica, además de que la interpretación de sus resultados no deja lugar a duda del daño producido (Zúñiga 1996). El usar esta prueba en biomonitores que presenten MN espontáneos, nos da la oportunidad de estudiar el efecto de sustancias genotóxicas y sus metabolitos.

Con la finalidad de conocer las limitantes de algunos modelos bioindicadores de micronucleogénicos con respecto a su edad y sexo, nos hemos dado a la tarea de estudiar estos parámetros en el presente trabajo, ya que algunos autores han descrito diferencias en el número de MN con respecto a esto (Allen, *et al.*, 1996; Bolognesi, *et al.*, 1997; Bolognesi, *et al.*, 1999; Lowe, *et al.*, 1995; Torres-Bugarín, *et al.*, 1999; Wulf, *et al.*, 1996; Yusuke, *et al.*, 1991; Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 2000). Además, en un estudio reciente realizado en 54 especies, se observaron diferencias en los valores de EMN en 10 ardillas de esta especie (Zúñiga-González, *et al.*, 2000).

Es probable que exista una relación entre el peso del organismo y su edad (individuos jóvenes tendrán menos peso corporal, mientras que los adultos serán más pesados) y que posiblemente entre más jóvenes estén los individuos sea mayor el número de EMN con respecto al de los adultos; por tanto, se propone que al seleccionar aquellos organismos que puedan ser empleados como

biomonitores de agentes genotóxicos, específicamente micronucleogénicos, es importante saber la variabilidad de respuesta con respecto a la edad y al sexo que existe entre los individuos de la especie a estudiar.

HIPÓTESIS

El número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica varía con el peso-edad y sexo de la ardilla gris *Sciurus aureogaster*.

OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* en relación al peso-edad y sexo.

PARTICULARES:

1. Evaluar el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* cada 15 días, por un período mínimo de 6 meses.
2. Relacionar el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* respecto al peso-edad.
3. Relacionar el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* respecto al sexo.

TESIS/CUCBA

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 11 ardillas grises de la especie *Sciurus aureogaster*, sanas, 9 machos y 2 hembras, y debido a que esta especie no ha sido estudiada en este sentido y a que no existe un bioterio que las reproduzca en cautiverio, los animales fueron adquiridos a un proveedor ambulante. Al ingresar al laboratorio, fueron identificadas con un número progresivo y se registró el sexo y peso de cada uno de ellos. Ya que no es posible conocer la edad de cada organismo, se propuso manejar el término peso-edad infiriendo que los animales jóvenes tenían menor peso corporal y los más viejos mayor peso. Los animales permanecieron en jaulas de acero inoxidable (54x30x36 cm). Tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*, que consistió en una dieta a base de manzana, naranja, uvas, mango, ciruelas, nueces, semillas de girasol, de calabaza y de maíz.

Los animales fueron tratados de acuerdo con los requerimientos Institucionales y Gubernamentales de México e Instituciones de Salud de los Estados Unidos de Norte América (Boletín AMCE 1996; Ley de Protección de los Animales 1981; SEMARNAP 1997-2000).

o Grupo de trabajo

Se realizó el seguimiento de la variabilidad de EMN en sangre periférica de los animales, cada 15 días, por un período de 6 meses.

Todos los animales fueron pesados al inicio del experimento y se les tomó una muestra de sangre. Las ardillas se mantuvieron en observación para su adaptación al laboratorio por un período de 9 días para su aclimatación al laboratorio, tiempo suficiente para que los EMN tomaran su nivel normal posterior a una posible exposición a algún genotóxico desconocido, puesto que los sistemas "limpiadores" captan en primer lugar a las células dañadas con el objeto de destruirlas y eliminarlas (Hillman y Finch 1987). Después de este tiempo se inició con el estudio.

o **Seguimiento de la frecuencia de Eritrocitos Micronucleados**

- Después de los nueve días de adaptación de los animales, se registró el peso corporal de cada uno de ellos y se tomó una muestra de sangre basal. Este dato sirvió para determinar la relación del peso-edad con respecto al número de EMN al iniciar el experimento.
- A partir de la fecha de inicio de la toma de muestra, se muestreó y se registró el peso corporal de cada animal cada 15 días por un período de 6 meses para observar la variabilidad de los EMN.

o **Toma de muestras.**

Se tomó una gota de sangre periférica vía vena femoral con aguja de calibre 22x32 mm. Se realizaron dos extendidos de sangre por cada animal, sobre portaobjetos limpios y se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron en etanol al 80% por

10 minutos y se dejaron secar por 24 h. Los frotis fueron teñidos con naranja de acridina (Hayashi, *et al*, 1983) (Figura 3).

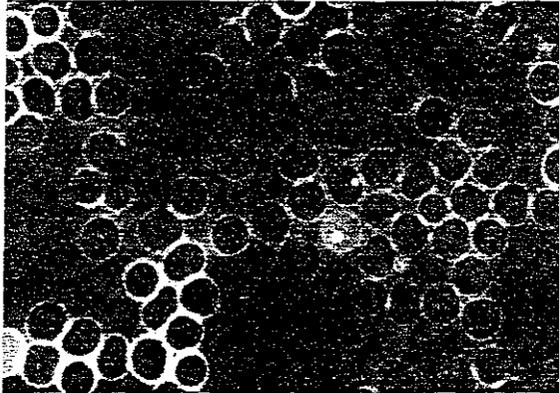


Figura 3. Frotis de eritrocitos micronucleados en sangre periférica teñidos con naranja de acridina.

o Análisis de muestras

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia, con el objetivo 100X, contando el número de EMN en 10,000 eritrocitos totales (ET). Se consideró el número de EPC en 1,000 ET y con estos valores se obtuvo el cociente de EPC y ENC para cada animal.

o Criterios de inclusión

Ardillas grises de la especie *Sciurus aureogaster*, de edad variable, sexo indistinto y sanas (que en el tiempo de estudio no presentaran alteraciones de conducta o falta de apetito), mantenidas en condiciones de laboratorio.

- **Criterios de exclusión**

Fallas técnicas que imposibiliten el conteo de las células micronucleadas en las laminillas y mortalidad de los animales antes y durante el estudio.

- **Definición de variables**

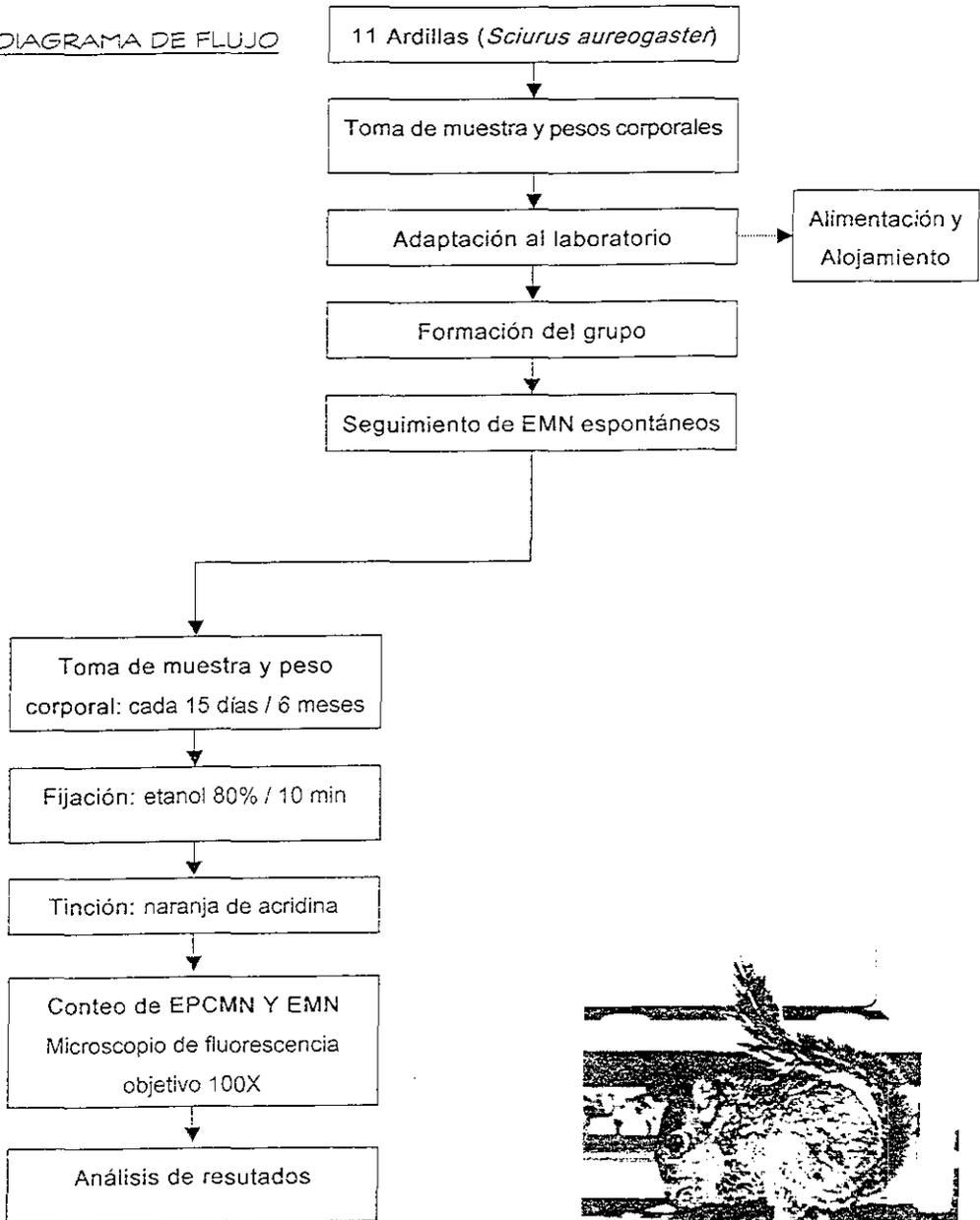
Variable independiente: Peso-edad.

Variable dependiente: Número de EMN en sangre periférica.

- **Análisis estadístico**

Los resultados fueron comparados por análisis de regresión lineal y correlación de Pearson.

DIAGRAMA DE FLUJO

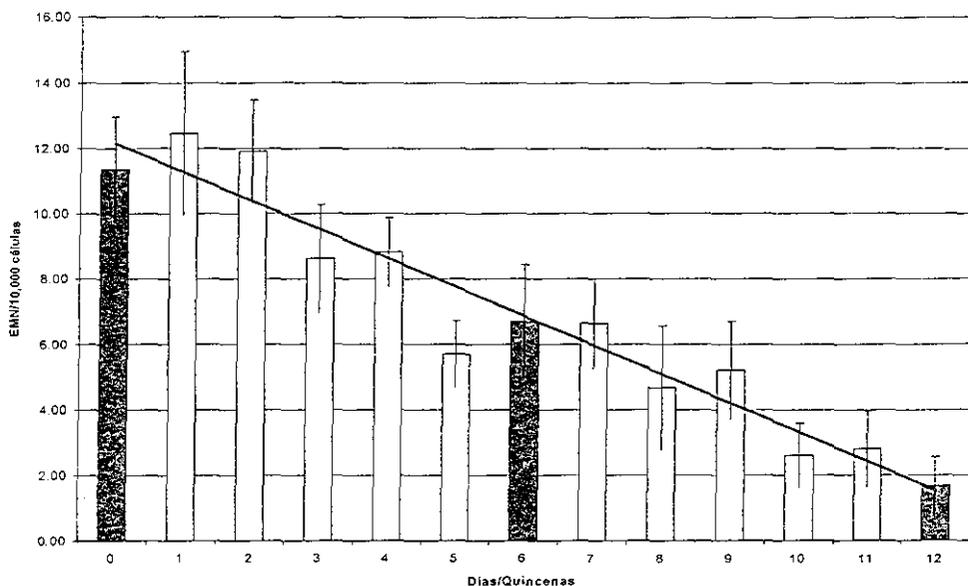


RESULTADOS

El número de EMN espontáneos en sangre periférica de las 11 ardillas *Sciurus aureogaster* fue mayor en los 5 animales menos pesados (animales jóvenes), los cuales tuvieron un peso promedio de 97.2 g y 14 EMN (83.0, 93.0, 97.0, 102.0, 111.0 g, respectivamente), mientras que el número fue menor en los 6 más pesados (animales viejos), con peso promedio de 148.3 g y 8.4 EMN (121.0, 127.0, 138.0, 140.0, 153.0, 211.0 g, respectivamente). Esto concordó con lo observado al finalizar el estudio a los 6 meses del experimento (Gráfica 1). Los valores obtenidos de los pesos corporales en los 11 animales muestran incremento conforme pasó el tiempo (Gráfica 1), donde al momento de la toma de muestra se obtuvo el valor promedio de 125.2 ± 33.0 g, a los tres meses de estudio fue de 264.0 ± 54.1 g y finalmente, a los 6 meses del experimento fue 342.8 ± 87.7 g, mientras que los EMN disminuyeron de 11.3 ± 5.3 a 6.7 ± 5.4 para finalmente terminar en 1.6 ± 1.5 . En cuanto al número de EPC de las ardillas, se observó disminución de los mismos. Desde que inició el experimento hasta los tres meses de estudio, se obtuvo 32% menos del número de EPC, mientras que a los 6 meses disminuyó en 64% comparado con el valor inicial.

GRÁFICA 1

Promedio \pm desviación estándar de EMN en 11 ardillas muestreadas cada 15 días durante 6 meses.



La correlación significativa entre el número de EMN en relación con el tiempo, muestra disminución tiempo-dependiente de EMN ($r=0.9249$). También se muestra la media de EMN y peso de las 11 ardillas al inicio (EMN: 11.3 ± 5.3 ; Peso: 125.2 ± 33.8 g), a los 3 meses (EMN: 6.7 ± 5.4 ; Peso: 264.0 ± 54.1 g) y a los 6 meses (EMN: 1.6 ± 1.5 ; Peso: 342.8 ± 87.7 g) del muestreo (barras de color rojo).

DISCUSIÓN

La presencia de MN en los eritrocitos de sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* fue demostrada con la tinción de naranja de acridina, colorante específico para ácidos nucleicos.

En el grupo de estudio se demostró que los animales aumentaron de peso a través del tiempo; este incremento puede relacionarse con mayor edad y a su vez, la edad ha sido relacionada con madurez del organismo (Gráfica 1). Al mismo tiempo, se observó disminución de EMN y EPC conforme pasaron los días. Esta disminución de EPC fue similar a la que se conoce en la rata (Mitruka, *et al.*, 1981) y en otras especies (Schalm, *et al.*, 1964), en las cuales los animales jóvenes muestran valores altos de EPC en sangre periférica, no así en los adultos, fenómeno que también es observado en especies en las que los EPC no están presentes comúnmente en la circulación en animales sanos (Schalm, *et al.*, 1964; Zúñiga-González, *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que la disminución de EMN en la ardilla gris está relacionada con la edad, pues es muy probable que en el caso de esta especie, su sistema reticuloendotelial madure conforme los individuos crecen y se desarrollan. Por lo tanto, al volverse este sistema más eficiente, es que puede retirar de la circulación con mayor rapidez los EMN. En el caso de especies, como la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), cuando su sistema reticuloendotelial ya se encuentra en estado maduro, comienza a retirar de la

circulación la mayoría de los EMN espontáneos, entre otras anomalías, disminuyendo con esto la probabilidad de que puedan ser observados en un frotis de sangre periférica. De cualquier manera, con base en los resultados, es conveniente para estudios futuros tener grupos de animales más homogéneos respecto a su edad, lo que dará menos dispersión en la desviación estándar y con esto, la posibilidad de observar aumento significativo en una prueba. Puesto que en el presente trabajo no fue posible tener las edades de las ardillas, la recomendación que sugerimos es que los animales que se utilicen en futuros experimentos tengan entre 125-264 g de peso corporal, ya que es cuando las ardillas tienen un tamaño adecuado para su manejo y EMN espontáneos en buen número.

En el caso del presente estudio, podríamos haber esperado tener menor número de EMN en los animales jóvenes, como se observa en el humano, Sin embargo, el hallazgo contrario de este estudio no nos sorprendió, ya que en 1996 el grupo de trabajo hipotetizó esta posibilidad al estudiar una jirafa recién nacida, la misma que falleció a las pocas horas de su nacimiento. En este organismo se encontraron 18 EMN y a partir de ello, se planteó la posibilidad de que este hallazgo pudiera haberse dado porque el animal fuera inmaduro o que presentara alguna patología desconocida que inclusive fuera la responsable de su muerte repentina. Posteriormente, se tuvo la oportunidad de obtener muestras de una jirafa adulta, la cual no presentó EMN espontáneos (Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*,

2000), lo cual sugería inmadurez de la jirafa recién nacida. Otro dato previo fue el que se observó en una zarigüeya joven, en la que también se encontró EMN en sangre periférica, mientras que en una zarigüeya adulta no se vieron estas estructuras. Si bien, el dato obtenido en sólo dos animales de dos especies diferentes, en su momento no permitió formular alguna conclusión contundente, los resultados obtenidos en el presente, sí permiten hacerlo.

Finalmente, los resultados obtenidos en las 11 ardillas durante los 6 meses, permite corroborar que el haber relacionado peso-edad para los fines de este trabajo fue acertado y las conclusiones obtenidas son reales.

Por último, con respecto al último objetivo de este trabajo, en cuanto a si existe o no una relación del número de EMN en sangre periférica de la ardilla gris con respecto al sexo, esto no fue posible cumplirlo, dado que el número de hembras y machos que se utilizaron en este grupo no fue suficiente como para realizar un estudio pareado y poder corroborar sin sesgo alguno este dato.

CONCLUSIONES

1. En las 11 ardillas *Sciurus aureogaster* el promedio de EMN espontáneos al inicio del experimento fue de 11.3 ± 5.3 en 10,000 ET.
2. La relación del número de EMN espontáneos en sangre periférica de la ardilla respecto al peso-edad, fue mayor en las 5 ardillas menos pesadas (más jóvenes), mientras que en los 6 animales más pesados (animales viejos) fue menor.
3. Esto mismo se observó en los animales que se muestrearon por seis meses, los cuales aumentaron de peso de forma paulatina durante el experimento.
4. El número de EMN disminuyó de 11.3 ± 5.3 hasta 1.6 ± 1.5 en 10,000 ET, al finalizar el estudio.
5. La relación del número de EMN espontáneos en sangre periférica de la ardilla gris con respecto a su género, no fue posible realizarla dado que el número de las ardillas utilizadas para este experimento fue insuficiente para llevar a cabo el análisis pareado por sexo. Por tal motivo este objetivo no se pudo cumplir.
6. Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis en la que se plantea que el número de EMN de la ardilla gris *Sciurus aureogaster* sí disminuye con la edad, además de que permite plantear que esto mismo sucede en otras especies.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afshari A, McGregor P, Allen J, Fuscoe J. Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen.* 1994; 24: 96-102.
2. Allen JW, Collins BW, Setzer RW. Spermatid micronucleus analysis of ageing effects in hamster. *Mutat Res.* 1996; 316: 261-266.
3. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995; 343: 121-135.
4. Bhunya S, Jena G. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BCH): an *in vivo* study in chicks. *Mutat Res.* 1992; 272: 175-181.
5. Boletín AMCE. Órgano informativo de la Asociación Mexicana de Cirugía Experimental, A.C. Principios Básicos para la Experimentación en Animales. México, D.F. 1996; 1.
6. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalpra L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6: 249-256.
7. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing.* 1999; 28: 393-397.
8. Corazza G, Ginaldi L, Zoli G, *et al.* Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function, a reassessment. *Clin Lab Haematol.* 1990; 12: 269-275.
9. Encarta® 98 Enciclopedia Microsoft®. ©1993-1997 Microsoft Corporation.
10. Gismondi E. Todo sobre la ardilla. Ed. de Vecchi. Barcelona. 1995: 11-35; 79-115.

11. Grant W, Lee H, Logan D, Salamone M. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassay for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat Res.* 1992; 270: 53-64.
12. 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.
13. Hayashi M, Sofoni T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 120:241-247.
14. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofoni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990; 245: 245-249.
15. Heddle J, Lue C, Saunder E, Benz R. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as a measure by the micronucleus method. *Cancer Res.* 1978; 38: 2983-2988.
16. Heddle J, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, McGregor J, Newell G, Salamone M. 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.
17. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, *et al.* Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991; 18: 277-291.
18. 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.
19. Hillman RC, Finch CA. El Eritrocito. 5ª edición. Ed. El Manual Moderno. México. 1987: 1-35.
20. Hillman RC, Clement AF, Boggs DR, Winkelstein A. Manual de Hematología. 8ª edición. Ed. El Manual Moderno. México. 1990: 317.
21. 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.

22. 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.
23. Krogh JM, Nyfors A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells *in vivo*. *Mutat Res.* 1979; 64: 339-343.
24. Lähdetie J. Micronucleus induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res.* 1983; 120: 257-260.
25. Lewin B. Genes En: El ADN es el material genético. 2^{da} edición. Ed. Reverté. 1993: 71-95.
26. Lowe X, Collins B, Allen J, *et al.* Aneuploidies and micronuclei in the germ cells of male mice of advanced age. *Mutat Res.* 1995; 338: 59-76.
27. MacKey BE, MacGregor JT. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutat Res.* 1979; 64: 195-204.
28. Mettler M. Ardillas. Ed. Tikal. Barcelona. 1996:139.
29. 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.
30. Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in experimental animals and normal humans. 2nd edición. Ed. Masson Publishing. New York. 1981: 31-62
31. Novales CX, Amato MJ. Sistema linfohemático. 1^a edición. Ed. Limusa, México, D.F. 1993: 57-124; 160-165.
32. 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.
33. Pearson HA, Hohnston D, Smith KA, *et al.* The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. *N Engl J Med.* 1978; 298: 1389-1392.

34. Perera FP, Hemminki K, Gryzbouska E, Motykiewicz G, Michalska J, Sautella RM, Young TL, Dickey C, Brandt-Ranf P, De Vivo I, Blaner W, Tsail WY, Chorazy M. Molecular and genetic damage in human from environmental pollution in Poland. *Nature*. 1992; 360: 256-258.
35. Perera FP. Environment and cancer. Who are susceptible?. *Science*. 1997; 28: 1068-1073.
36. Rao KS. DNA-damage & DNA-repair in ageing brain. *Med Res*. 1997; 106: 423-437.
37. Rodríguez-Ariza A, Nieves A, Navas JI, *et al*. Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ Mol Mutagen*. 1992; 19: 112-124.
38. Russo A, Levis AG. Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelatin agents: induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. *Environ Mol Mutagen*. 1992; 19: 125-131.
39. Salamanca F. Citogenética y mutaciones En: Citogenética humana. 1ª edición. Ed. Panamericana. México, D.F. 1990: 219-233.
40. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 1987; 2: 11-17.
41. Schalm OW. Eritrocitos: producción, función y destrucción. En: Hematología Veterinaria. 1ª edición. Ed. Uteha. México, D.F. 1964: 83-222.
42. Schlegel R, MacGregor J, Everson R. Assesment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res*. 1986; 46: 3717-3721.
43. Schmezer P, Pool BL, Lefevre PA, *et al*. Assay-specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver *in vivo*. *Environ Mol Mutagen*. 1990;15:190-197.
44. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975; 31: 9-15.
45. SEMARNAP. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural, 1997-2000 México. 1997, SEMARNAP-INE, 17-24, 80.

46. Shuilin H, Baker RSU. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen*. 1989; 14: 1-5.
47. Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, *et al*. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 22: 101-106.
48. Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ Mol Mutagen*. 1987; 9: 37-58.
49. Torres Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreather by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res*. 1998; 413: 277-281.
50. Torres-Bugarín O, Zamora-Perez AL, Esparza-Flores A. Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1999; 56(4): 212-217.
51. 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.
52. Wulf HC, Kousgaard N, Niebuhr E. Sister-chromatid exchange in childhood in relation to age and sex. *Mutat Res*. 1996; 174: 309-12.
53. Yamamoto K, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res*. 1980; 71: 127-131.
54. Yusuke N, Hajime M, Yuji S, *et al*. Effect of estrogen on induction of micronuclei by mutagen in male mice. *Mutat Res*. 1991; 263: 21-26.
55. Zúñiga González Guillermo M. 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. 1996.
56. 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*. 1996a; 361: 107-112.

57. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res.* 1996b; 369: 123-127.
58. Zúñiga-González G, Ramírez-Muñoz MP, Torres-Bugarín 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-arabioside. *Mutat Res.* 1998, 413: 187-189.
59. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Perez 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.
60. 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.* 2001; 494: 161-167.

TESIS/CUCBA