

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Veterinarias



ACUMULACIÓN DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN SANGRE
PERIFÉRICA DE LA ARDILLA GRIS (*Sciurus aureogaster*)
INDUCIDOS CON DOSIS ACUMULATIVAS DE COLCHICINA

TESIS PROFESIONAL
para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

P.M.V.Z. Andrés Fernando Ríos Núñez

Director:
Biol. María Luisa Ramos Ibarra

Asesor :
Biol. Ana Lourdes Zamora Perez

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Septiembre 2002

Este trabajo se realizó en el
LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS
Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Instituto Mexicano del Seguro Social

Bajo la Dirección de:
Biol. María Luisa Ramos Ibarra

La Asesoría de:
Biol. Ana Lourdes Zamora Perez

Colaboración de:
M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda
Dra. en C. Olivia Torres Bugarín
Dr. en C. Guillermo Zúñiga González

Agradecimientos

A DIOS

Por darme el regalo más grande (la vida).

A MIS PADRES

Por su apoyo desinteresado y por el sacrificio con que lograron hacer de mi una persona de provecho.

A MIS HERMANOS

Ana Lilia

Fernando

Martín

Lourdes

Por su apoyo incondicional.

A MI ESPOSA

Por darme aliento y ser el motor de mi vida.

A MIS HIJOS

Por darme ánimos para seguir adelante.

AL LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS DEL CIBO, IMSS

Por apoyarme y permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A MIS MAESTROS

Por haberme hecho crecer con sus enseñanzas.

ACUMULACIÓN DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS
EN SANGRE PERIFÉRICA DE LA ARDILLA GRIS (*Sciurus
aureogaster*) INDUCIDOS CON DOSIS ACUMULATIVAS DE
COLCHICINA.

ÍNDICE.-

	PÁGINA
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
☞ Prueba de micronúcleos.	2
☞ Ventajas y limitaciones.	4
☞ Micronúcleos.	5
☞ Micronúcleos en sangre periférica.	6
☞ Micronucleogénicos.	8
☞ Colchicina.	9
☞ En quiénes encontramos micronúcleos.	12
☞ Bioindicadores.	13
☞ Ardillas.	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODO	25
☞ Tipo de estudio.	25
☞ Selección de animales.	25
☞ Grupo de trabajo y acumulación de eritrocitos micronucleados.	25
☞ Toma de muestras.	26
☞ Análisis de muestras.	27
☞ Criterios de inclusión.	27
☞ Criterios de exclusión.	27
☞ Definición de variables.	27
☞ Consideraciones éticas.	28

☞	Análisis estadístico.	28
☞	Diagrama de flujo.	29
	RESULTADOS	30
	DISCUSIÓN	32
	CONCLUSIONES	35
	BIBLIOGRAFÍA	36
	CUADROS	
☞	I. Orden de roedores.	16
☞	II. Clasificación taxonómica.	17
☞	III. Diferencias en el número de EMN/10,000 ET por la administración de colchicina durante 3 días.	31
	FIGURAS	
☞	Figura 1. Células micronucleadas en diferentes tejidos y especies.	3
☞	Figura 2. Frotis de eritrocitos micronucleados en sangre periférica.	4
☞	Figura 3. Formación de micronúcleos.	6
☞	Figura 4. Precursores de eritrocitos en mamíferos.	7
☞	Figura 5. Colchicina.	10
☞	Figura 6. Mecanismo de acción de los derivados de plantas.	11

RESUMEN.-

Con la finalidad de detectar compuestos que fracturan o rompen cromosomas se utiliza la prueba de micronúcleos (MN), que es económica, rápida y sobre todo, no deja lugar a dudas de la pérdida de material genético en el núcleo de las células hijas. En el presente estudio se observó el daño acumulado de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica de la ardilla gris *Sciurus aureogaster*. Este grupo de animales recibió colchicina por tres días consecutivos y estuvo formado con animales jóvenes y viejos. Se contaron los EMN en 10,000 eritrocitos totales (ET) cada 24 h, hasta completar 120 h de estudio. El análisis estadístico mostró incremento de EMN a las 48, 72, 96 y 120 h, considerando los valores de todos los animales. Al dividir a las ardillas por su peso-edad, se observó diferencia a las 72 ($p < 0.01$), 96 ($p < 0.02$) y 120 ($p < 0.004$) h en las jóvenes y a las 72 ($p < 0.03$) y 96 ($p < 0.01$) h en las viejas. La proporción de eritrocitos policromáticos (EPC) no se alteró, por tanto, en este caso el medicamento no fue tóxico, sin embargo, los individuos jóvenes presentaron mayor número de EPC/1,000 ET (25.6 ± 13.2) que los viejos (12.0 ± 7.3).

INTRODUCCIÓN.-

La contaminación en diferentes ciudades del mundo ha sido asociada con el incremento en el riesgo de contraer cáncer (Perera, *et al.*, 1992). Varias actividades humanas aumentan la contaminación; agentes de origen físico, como las radiaciones, pueden ocasionar daño celular y mutaciones (Schull 1983; Martin, *et al.*, 1986), mientras que otros químicos, como los residuos de las minas, pesticidas, desechos urbanos, etc., también pueden afectar ecosistemas marinos y subsecuentemente, dañar al hombre a través de cadenas tróficas (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992). 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 (Miguel, *et al.*, 1990). 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 bioindicadores (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992). El utilizar biomonitores, en pruebas para detectar genotóxicos, ofrece grandes ventajas en comparación con otras que se realizan *in vitro*, ya que un organismo vivo puede procesar o metabolizar un compuesto a su forma tóxica (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992).

Dado que los métodos convencionales que se utilizan en la actualidad para determinar daño genotóxico resultan ser de costo elevado, es conveniente buscar nuevas formas, así como modelos de evaluación que sirvan como indicadores de sustancias con efecto genotóxico. Una alternativa es la prueba de micronúcleos (MN) (Schmid 1975; Heddle, *et al.*, 1991), realizada en diferentes tejidos y especies animales (Torres-Bugarín, *et al.*, 1998; Zúñiga, *et al.*, 1996^a; Zúñiga-González, *et al.*, 2000; Zúñiga-González, *et al.*, 2001).

⊗ Prueba de micronúcleos.

Sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, conocidos como MN, que quedan fuera del núcleo en mitosis (Schmid 1975; Heddle *et al.*, 1983).

Esta prueba se realiza en tejidos de proliferación celular continua (Figura 1), (Schmezer, *et al.*, 1990; Suzuki, *et al.*, 1993) tales como: médula ósea (Schmid 1975), hepatocitos (Schmezer, *et al.*, 1990), mucosa bucal (Torres-Bugarín, *et al.*, 1998), queratinocitos (Shuilin y Baker, 1989) y en células germinales, en las que de existir daño, éste podría ser transmitido a la descendencia (Lähdetie 1983;

Russo y Levis, 1992) y de ahí la importancia de detectar estas alteraciones a tiempo.

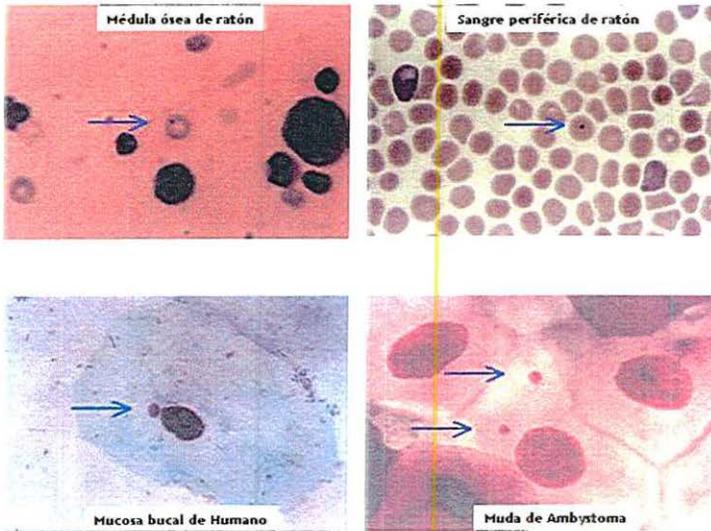


Figura 1. Células micronucleadas en diferentes tejidos y especies.

La prueba de MN en eritrocitos de sangre periférica se puede realizar en eritrocitos policromáticos (EPC), esto es, eritrocitos jóvenes, para el caso de pruebas de 24 a 48 h y en eritrocitos normocromáticos (ENC) o eritrocitos viejos, para estudios de exposición crónica o en su caso cuando se utilizan especies que no presenten de manera normal EPC (Zúñiga-González, *et al.*, 1998). Es importante tomar en cuenta que debido a que los EPC no pierden los ribosomas por aproximadamente 24 h después de la enucleación, estos se tiñen de color azul-gris con colorante de Giemsa (Hedde, *et al.*, 1983) o de color rojo con anaranjado de acridina (Hayashi,

et al., 1990), lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de períodos cortos de exposición (Figura 2).

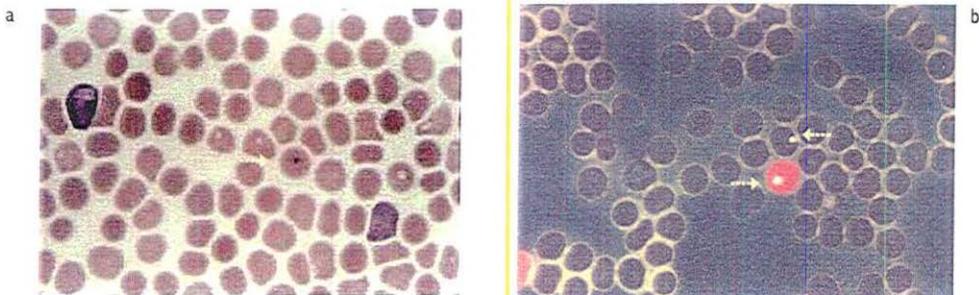


Figura 2. Frotis de eritrocitos micronucleados en sangre periférica: a) Tinción con giemsa; b) Tinción con naranja de acridina.

☞ Ventajas y limitaciones.

Ventajas (Schmid, 1975; Heddle, *et al.*, 1983; Sarto, *et al.*, 1987):

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

Limitaciones (Heddle, *et al.*, 1983; Jaylet, *et al.*, 1986):

1. No detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de fragmentos acéntricos, como translocaciones e inversiones).
2. No es útil en poblaciones celulares que no se dividen.

38 Micronúcleos.

En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly (Schmid 1975; Heddle, *et al.*, 1978). 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 (Schmid 1975; Corazza, *et al.*, 1990). Su formación 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 centrómero darán 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. Estos son mucho más pequeños que el núcleo principal, por lo que son llamados MN (Figura 3) (Heddle, *et al.*, 1983).

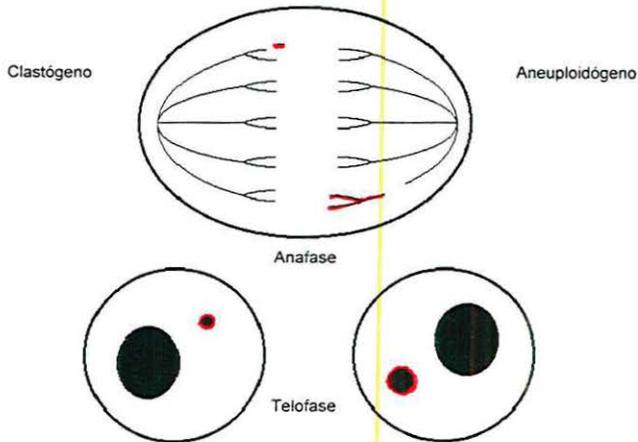


Figura 3. Formación de micronúcleos.

Eventos similares ocurren si se daña el huso mitótico, por ejemplo bajo la influencia de la colchicina, por lo que aparecen MN grandes fuera del núcleo, esto se debe a que cromosomas completos son los que constituyen a estos MN (Yamamoto y Kikuchi, 1980; Heddle, *et al.*, 1983).

☞ 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 desgarrá, sólo que ésta 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 que el eritoblasto 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) (Figura 4).

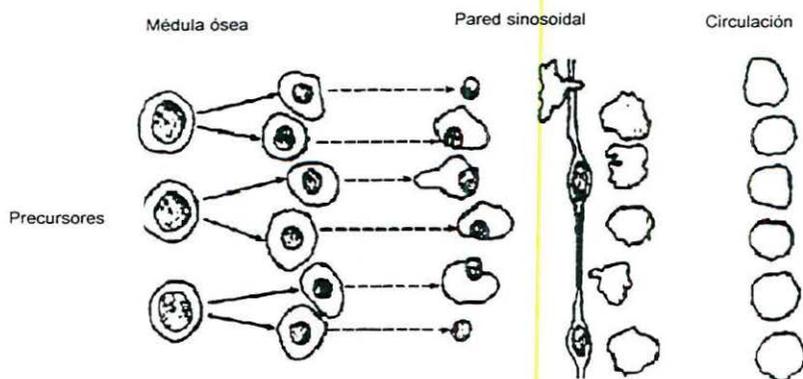


Figura 4. Precursores de eritrocitos en mamíferos.

En el humano, los MN son las anomalías más características después de la esplenectomía (Pearson, *et al.*, 1978; Corazza, *et al.*, 1990). 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 dañados se manifiesta por el aumento de éstos en la circulación 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). El número de MN espontáneos en eritrocitos de sangre periférica de humano es cercano a cero en 10,000 eritrocitos totales (ET). Sin embargo, cuando por alguna indicación del hematólogo, el paciente es esplenectomizado, éste de inmediato incrementa el número de MN de manera significativa en la circulación (ya que el control de destruir a los eritrocitos anormales en esta especie lo ejerce casi en su totalidad éste órgano) y más aun si el individuo sin bazo se expone a genotóxicos, como los medicamentos antineoplásicos. Los eritrocitos micronucleados (EMN) se pueden observar en un simple frotis de sangre periférica (Schlegel, *et al.*, 1986; Zúñiga, *et al.*, 1996b).

⊗ Micronucleogénicos.

Existen muchos compuestos que inducen efectos genotóxicos. La interacción de los compuestos de manera indirecta puede causar cambios en la conformación del ADN, lo que podría ocasionar ruptura de hebras. Asimismo, si se causa daño

a las proteínas que conforman la maquinaria para la mitosis, se pueden formar MN (Stopper 1993). Los mecanismos de acción de los diferentes agentes que causan rompimientos cromosómicos varían, algunos afectan a los grupos sulfhidrilo de proteínas, mientras que otros actúan sobre los puentes de hidrógeno de los ácidos nucleicos o afectan el sistema de óxido-reducción dentro del núcleo (Sharma 1980). Una forma de clasificar a los fármacos es según su mecanismo de acción (Becker 1985; Lazo y Larner, 1994; Pratt, *et al.*, 1994; Hellman y Vokes, 1996; De Vita, *et al.*, 1997).

⊗ Colchicina.

Existen sustancias de conocida micronucleogenicidad, como la colchicina. Este fármaco actúa bloqueando la formación del huso mitótico, originando de esta manera el rezago de cromosomas completos que no se incluyen en los núcleos hijos (Figura 5) (Pearson, *et al.*, 1978; Yamamoto y Kikuchi, 1980; Iwai y Arimura, 1990; Williams, *et al.*, 1990).

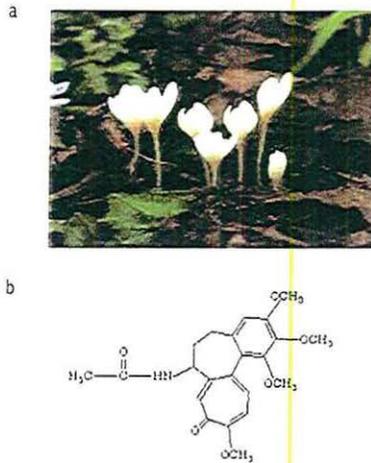


Figura 5. Colchicina: a) *Colchicum autumnale*; b) Estructura Química

Clasificación Farmacológica: Es un alcaloide aislado del azafrán o cólquico, *Colchicum autumnale*.

Clasificación Terapéutica: Antigotoso

Generalidades: la colchicina inhibe la división celular al unirse a la proteína tubulina. La tubulina, como su nombre lo indica, forma fibras microtubulares que ayudan a dirigir la división celular. Estas fibras jalan a los cromosomas duplicados a cada lado de la célula parental, asegurando que cada célula hija reciba un juego completo de cromosomas. Además de su papel en la mitosis, los microtúbulos son necesarios en el mantenimiento de la estructura celular y en el proceso de secreción y neurotransmisión a lo largo de los axones (Beaula y Subramanyam, 1991; Hellman y Vokes, 1996; Ramírez-Muñoz, *et al.*, 1999). Por otra parte, los medicamentos que interfieren con el ensamblaje o

desensamblaje de estas fibras de tubulina pueden evitar una división celular exitosa (Figura 6) (Lazo y Larner, 1994; Pratt, *et al.*, 1994; Hellman y Vokes, 1996; De Vita, *et al.*, 1997).

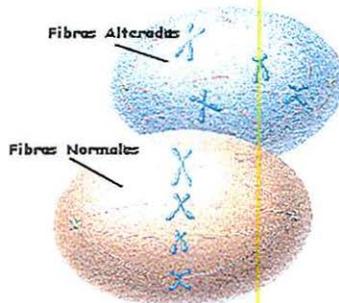


Figura 6. Mecanismo de acción de los derivados de plantas: inhibidores de microtúbulos

Farmacodinamia: la colchicina tiene acción antigotosa e interviene en la inhibición de la migración leucocitaria al reducir la producción de ácido láctico por los leucocitos. La colchicina actúa como antiinflamatorio por fijación a la proteína microtubular tubulina, impidiendo así su polimerización e inhibiendo por tanto la emigración de leucocitos y la fagocitosis. Varios de los efectos adversos de la colchicina se deben a su bloqueo de la polimerización de tubulina y de la mitosis celular (McVan 1995).

Farmacocinética: la colchicina se absorbe fácilmente después de administración oral y alcanza sus valores plasmáticos máximos en un lapso de dos horas. Los metabolitos del medicamento son excretados por vía intestinal y en la orina.

Absorción: cuando se administra por vía oral, la colchicina se absorbe desde las vías gastrointestinales. El fármaco sin cambio puede resorberse en el intestino mediante procesos biliares.

Distribución: se distribuye rápidamente en varios tejidos después de su resorción desde el intestino. Se concentra en los leucocitos y se distribuye en los riñones, hígado, bazo y vías intestinales, pero está ausente en corazón, músculo esquelético y cerebro.

Metabolismo: se metaboliza parcialmente en el hígado y también lentamente en otros tejidos.

Excreción: la colchicina y sus metabolitos se excretan principalmente en las heces, y cantidades menores se excretan en la orina (McVan 1995).

⊗ En quiénes encontramos micronúcleos.

Opuesto a lo que sucede en el humano, existen especies que de manera natural presentan EMN espontáneos visibles en la circulación y por esta característica se pueden proponer como bioindicadores. Los animales más comunes con estas características son los roedores (Hart y Hartley-Asp, 1983; Heddle, *et al.*, 1983; Hayashi, *et al.*, 1990). También, 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. Tal es el caso de algunas ranas (Krauter, *et al.*, 1987; Rudek y Rozek, 1992; Fernández y

l'Haridon, 1994) y de urodelos (Jaylet, *et al.*, 1986; Lee, *et al.*, 1992). Por otro lado, los peces no han sido la excepción y se han propuesto también como biomonitores (Krauter, *et al.*, 1987), al igual que aves como los pollos (Bhunya y Jena, 1992; Jena y Bhunya, 1995). En el caso de los invertebrados, también se ha estudiado la posibilidad de proponerlos como bioindicadores y entre ellos se cuentan algunos bivalvos (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992; Burgeot, *et al.*, 1995; Walmann, *et al.*, 1995) y finalmente, las plantas, ya que también pueden manifestar daño por agentes contaminantes con efecto genotóxico, en las que se utilizan los meristemas de la raíz o el polen para la observación de los MN (Grant, *et al.*, 1992; Ruíz, *et al.*, 1992; Ma, *et al.*, 1995).

⊗ Bioindicadores.

Se conoce que en estudios de toxicología genética se requiere de más de una prueba para detectar daño en el material genético, con la finalidad de detectar o predecir con confiabilidad los efectos genotóxicos de una sustancia (Jena y Bhunya, 1995). Además de que el monitoreo de estos agentes requiere de gran precisión y conocimiento del contaminante a verificar, su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioindicadores ofrecen ventajas ya que un organismo vivo puede transformar un compuesto cualquiera a metabolitos que podrían ser aun más tóxicos que el

compuesto original (Miguel, *et al.*, 1990; Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). Es importante mencionar que la ventaja que ofrecen los bioindicadores es que al metabolizar sustancias químicas mutagénicas u oncogénicas nos dan mayor seguridad en nuestros resultados. De ahí la importancia de que se recomiende que cualquier estudio realizado *in vitro* incluya un sistema de activación metabólica 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 al ADN. En el caso de la prueba de MN, un requisito principal es que aquellos organismos que serán expuestos al posible agente genotóxico deberán reponder formando MN en número suficiente para que al realizar el análisis por conteo se observe incremento significativo en su número. Respecto a los eritrocitos de sangre periférica el planteamiento es que si una especie presenta EMN espontáneos en buen número (6 o más en 10,000 eritrocitos), se debe a que el sistema reticuloendotelial no tiene un estricto control sobre éstos y por tanto, lo esperado es que si a estos organismos se les expone a agentes micronucleogénicos, el número de EMN se incrementará. Este evento permite detectar agentes micronucleogénicos mediante el estudio comparativo de los EMN de sangre

periférica de la especie a estudiar (Zúñiga, *et al.*, 1996a, Zúñiga-González, *et al.*, 1998; Zúñiga-González, *et al.*, 2000; Zúñiga-González, *et al.*, 2001).

En el laboratorio de Mutagénesis, una de las líneas es identificar y seleccionar aquellas especies que presenten el mayor número de MN en tejidos que sean viables de analizar (sin causarles gran daño a los animales al obtener la muestra), para proponerlos como probables bioindicadores de daño genotóxico (Zúñiga 1996; Zúñiga, *et al.*, 1996a; Zúñiga-González, *et al.*, 2000; Zúñiga-González, *et al.*, 2001). De alrededor de 130 especies diferentes de animales muestreados, se ha encontrado que los Órdenes que han presentado mayor número de EMN espontáneos, fueron el de los felinos y roedores. De 7 especies muestreadas de roedores, la ardilla terrestre, cuyo y rata presentaron niveles muy bajos de EMN mientras que el ratón, hámster, gerbo y ardilla gris presentaron elevado número de EMN (Cuadro I). Sin embargo, los 3 primeros ya han sido estudiados como posibles modelos (Zúñiga, *et al.*, 1996a; Zúñiga-González, *et al.*, 2000; Zúñiga-González, *et al.*, 2001).

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

Valores promedio y desviación estándar de EMN espontáneos en sangre periférica de algunas especies de roedores.

⊗ Ardillas.

Clasificación taxonómica y generalidades

El Orden de los roedores, con 29 Familias, 380 géneros y 1,687 especies, tiene más miembros que cualquier otro Orden de mamíferos. La ardilla es un roedor que pertenece a la Familia Sciuridae (Cuadro II) y se compone de 3 géneros e incluye a todas las especies terrestres y arborícolas (Encarta 1998).

Cuadro II. Clasificación taxonómica

ARDILLA GRIS

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 longitud total promedio de 49 cm, el dorso es de color gris con tonos café rojizos y cola de aproximadamente 23 cm. En estado adulto el peso promedio de las ardillas grises es de 496.5 g, aunque pueden llegar a pesar hasta 570 g. Las patas delanteras tienen cuatro dedos que son menos largos que los de las patas traseras, las cuales tienen cinco dedos (Gismondi 1995; Mettler 1996). Son de hábitos solitarios y sus actividades, a diferencia del ratón, las realizan durante el día, desplazándose entre las ramas de los árboles donde obtienen su alimento. 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 (Encarta 1998; Gismondi 1995; Mettler 1996). Su alimento básicamente consiste de brotes, conos, frutos carnosos de árboles, retoños de plantas, corteza

de los árboles, y otros tipos de vegetación, pero principalmente consumen grandes cantidades de semillas, nueces y bellotas; en algunas ocasiones, pueden comer insectos u otros invertebrados, también huevos de aves y pequeños vertebrados y crías de aves.

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, nacen un promedio de 4 a 5 crías, las cuales nacen poco desarrolladas, ciegas y sin pelo. A los pocas días de nacidas (alrededor de 14 días), su cuerpo ya está recubierto de pelo, y al cabo de 20 a 30 días abren los ojos. Aun así las crías permanecen con la madre varios meses antes de alejarse; debido a este largo período de crianza las hembras por lo general no tienen más de dos partos por año (Gismondí 1995).

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

En general, las ardillas están distribuidas por todo el mundo, excepto Australia. Suelen vivir en bosques caducifolios o de coníferas, aunque es posible encontrar especies adaptadas a vivir en hábitats muy distintos y han desarrollado estrategias que les permiten soportar temperaturas extremas en diferentes ecosistemas (Encarta 1998). La ardilla gris se encuentra en Hispanoamérica y va desde el sur de Tamaulipas hasta Centroamérica; y respecto a su distribución nacional, 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).

Por tanto, como la ardilla gris es un mamífero que tiene amplia distribución geográfica, principalmente en nuestro país, específicamente en el caso de *Sciurus aureogaster*, y además con la ventaja de que no se encuentra en peligro de extinción y lo más importante para este estudio, es que presenta elevado número de EMN espontáneos en sangre periférica (Zúñiga-González, *et al.*, 2000), el objetivo principal de este trabajo fue determinar si la ardilla gris, como bioindicador de agentes micronucleogénicos, podría utilizarse en estudios de exposiciones subagudas a genotóxicos, mediante observación de acumulación de EMN totales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

En la actualidad, la existencia de agentes genotóxicos a los cuales están expuestos constantemente los organismos vivos (Montoya 1992), incrementa de manera significativa el daño ecológico (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992). La evaluación del monitoreo directo de estos agentes está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas, ya que un organismo vivo puede transformar un compuesto cualquiera a metabolitos que podrían ser aun más tóxicos que el compuesto original (Rodríguez-Ariza, *et al.*, 1992).

Muchas sustancias mutagénicas u oncogénicas deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado (Miguel, *et al.*, 1990), por ello se vuelve importante contar con nuevas alternativas sencillas y rápidas para su detección. Las pruebas toxicológicas requieren modelos *in vivo* para observar la variabilidad de respuesta en las especies expuestas a estos agentes, ya que con ellos se cuenta con la posibilidad de observar los efectos a corto y a largo plazo que producen los genotóxicos en el organismo debido al daño acumulado.

Con base en lo anterior y utilizando como modelo bioindicador de agentes micronucleogénicos a la ardilla gris, se formuló la siguiente pregunta de investigación:

¿La administración de tres dosis consecutivas de colchicina a la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*) produce acumulación de EMN en sangre periférica?

JUSTIFICACIÓN.-

La gran cantidad de compuestos químicos, físicos y biológicos a los que estamos expuestos (Córdoba, *et al.*, 2000) obliga a la búsqueda de nuevas alternativas o modelos que nos indiquen el papel que juegan en el medio ambiente y su interacción con los seres vivos. Actualmente existen diversas pruebas para determinar los efectos adversos que pudieran ocasionar. Sin embargo, debido a que en toxicología genética se requiere de más de una prueba para determinar el potencial genotóxico de un compuesto (Jena y Bhunya, 1995), poder contar con diversas opciones es vital. La prueba de MN no deja lugar a duda del daño producido (Zúñiga 1996; Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 2000; Zúñiga-González, *et al.*, 2001), por tal razón, se evaluó a la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), como modelo *in vivo* para detectar daño acumulado, con la finalidad de proponerla para estudios toxicológicos en exposición subaguda al observar acumulación de EMN en su sangre periférica.

HIPÓTESIS.-

Los eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*) se acumulan al administrar dosis consecutivas de colchicina.

OBJETIVOS.-

General

Evaluar la acumulación de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*) al administrarle tres dosis consecutivas de colchicina.

Específicos

1. Inducir incremento de eritrocitos policromáticos y normocromáticos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris.
2. Determinar la proporción de eritrocitos policromáticos y normocromáticos en sangre periférica de la ardilla gris.

MATERIAL Y MÉTODO.-

☉ Tipo de estudio.

Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo.

☉ Selección de animales.

Se utilizaron 8 ardillas grises de la especie *Sciurus aureogaster*, sanas, de sexo indistinto, adquiridas a un proveedor ambulante. Al ingresar al laboratorio, los animales fueron identificados con un número progresivo y se registró el sexo y peso de cada uno de ellos. Cada par de ardillas se mantuvo en jaulas de acero inoxidable (54x30x36 cm) y tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*, que consistió en dieta a base de manzana, naranja, uvas, mango, ciruelas, nueces, semillas de girasol, de calabaza y de maíz.

☉ Grupo de trabajo y acumulación de eritrocitos micronucleados.

Se formó un grupo con 8 animales, de los cuales la mitad fueron individuos jóvenes y el resto adultos. Estos animales recibieron una inyección subcutánea de colchicina de 0.086 mg/kg en 200 μ l de agua inyectable, cada 24 h por tres días y se tomaron muestras de sangre a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, en las que se cuantificó el número de EMN en 10,000 ET de cada muestra, con la finalidad de observar la acumulación de EMN en el tiempo, lo cual permitió determinar si el

modelo podría utilizarse en estudios de exposiciones subagudas a genotóxicos. El interés de obtener la proporción de EPC se hizo con la finalidad de determinar si la médula ósea no se deprimía con el medicamento. Como observación, la dosis empleada se determinó de acuerdo a un estudio previo (Zúñiga-González, *et al.*, 1998).

Todos los individuos se mantuvieron en el laboratorio por 9 días previos al experimento para su observación y adaptación. Dado que se desconocía con exactitud la procedencia y las probables exposiciones a genotóxicos a los que pudieron estar expuestos, el tiempo de adaptación da la oportunidad al sistema reticuloendotelial de que elimine de la circulación los EMN que se hayan producido, ya que se conoce que en condiciones normales del organismo los eritrocitos dañados serán destruidos y eliminados (Hillman y Finch, 1987; Zúñiga-González, *et al.*, 1998).

⊗ Toma de muestras.

Se tomó una muestra de sangre periférica vía vena femoral con aguja de calibre 22x32 mm, de la cual sólo se necesitó una gota del tejido para realizar dos extendidos de sangre de cada animal sobre portaobjetos, los cuales se secaron a temperatura ambiente y se fijaron en etanol al 80% por 10 minutos y se tiñeron con naranja de acridina (Hayashi, *et al.*, 1983).

☉ Análisis de muestras.

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

☉ Criterios de inclusión.

Ardillas grises de la especie *Sciurus aureogaster* de edad variable, sexo indistinto y aparentemente 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 imposibilitaran el conteo de las células en las laminillas y mortalidad de los animales antes y durante el estudio.

☉ Definición de variables.

Variable independiente: Administración de colchicina vía subcutánea.

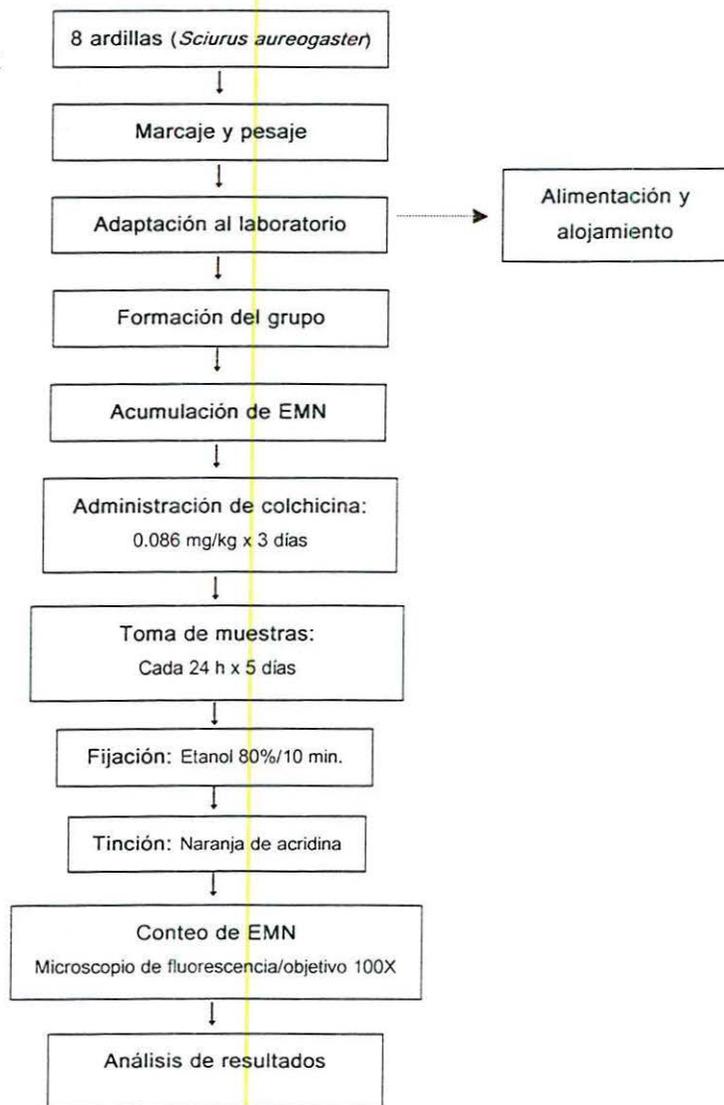
Variable dependiente: Número de EMN en sangre periférica.

⊗ Consideraciones éticas.

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 (Ley de Protección a los Animales 1981; Boletín AMCE 1996; SEMARNAP, 1997-2000).

⊗ Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante el programa Excel Office 2000 con prueba T de Student para muestras dependientes.

DIAGRAMA DE FLUJO.-

RESULTADOS.-

La diferencia entre el promedio de los valores basales de los 8 animales, cuatro jóvenes (animales con menos peso corporal) y cuatro adultos (animales más pesados) y la diferencia encontrada después de la administración de 0.086 mg/kg de colchicina por tres días consecutivos, se presenta en el Cuadro III. Cuando se compararon los datos de los 8 animales, el incremento de EMN fue significativo a las 48 ($p<0.03$), 72 ($p<0.001$), 96 ($p<0.002$) y 120 ($p<0.001$) h.

Cuando los animales fueron divididos por su peso (jóvenes y adultos), las diferencias fueron observadas a las 72 ($p<0.01$), 96 ($p<0.02$) y 120 ($p<0.004$) h en el caso de las ardillas jóvenes y a las 72 ($p<0.03$) y 96 ($p<0.01$) h en el caso de las ardillas adultas. La proporción de EPC no se alteró.

Cuando se analizaron por separado los valores de EPC entre ardillas adultas y jóvenes se apreció que estas últimas presentan mayor número de EPC (25.6 ± 13.2) que las adultas (12.0 ± 7.3).

Cuadro III. Diferencias en el número de EMN/10,000 ET por la Administración de colchicina durante 3 días.

n	HORAS					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Jóvenes	14.2±2.7	14.0±5.3	16.5±4.2	21.7±5.1	22.0±5.4	19.0±2.4
4		NS	NS	p < 0.01	P < 0.02	p < 0.004
Adultos	1.2±1.2	3.0±2.4	2.2±1.7	5.2±3.2	4.7±1.7	3.5±2.6
4		NS	NS	p < 0.03	p < 0.01	NS
Jóvenes + Adultos	7.7±7.2	8.5±7.0	9.3±8.1	13.5±9.6	13.3±9.6	11.2±8.6
8		NS	p < 0.03	p < 0.001	p < 0.002	p < 0.001

Los datos se expresan como media ± desviación estándar

n: tamaño de la muestra

NS: no significativo

DISCUSIÓN.-

En este estudio con 8 ardillas (cuatro jóvenes y cuatro adultas), a las cuales se les administraron tres dosis acumulativas de colchicina, se encontraron diferencias significativas de EMN a las 72, 96 y 120 h en los animales jóvenes (ardillas con menos peso corporal), mientras que en los viejos (ardillas con más peso corporal) las diferencias sólo se apreciaron a las 72 y 96 h. Sin embargo, cuando los datos de los 8 animales se juntaron y fueron comparados, el incremento de los EMN fue significativo desde las 48 h y hasta finalizar el estudio (Cuadro III). De esto es importante señalar que las ardillas con mayor peso corporal o viejas mostraron valores significativamente altos de EMN sólo hasta las 96 h, mientras que en las menos pesadas o jóvenes se prolongan estas diferencias hasta las 120 h. Este hallazgo concuerda con lo planteado, ya que siendo el sistema reticuloendotelial de los adultos más eficiente, retira los EMN de la circulación más rápido, así que a las 120 h ya fueron removidos gran parte de las células dañadas, por lo tanto, la diferencia ya no puede ser significativa. Los animales jóvenes, como tienen menos control sobre los EMN, permiten que éstos sean visualizados por más tiempo. Otro punto importante de señalar es respecto a las diferencias observadas cuando los animales son analizados todos juntos, ya que la significancia en la diferencia se manifiesta más temprano, con lo que queda claro que la ardilla gris (independientemente de las diferencias encontradas en el presente debido al peso)

funciona como bioindicador de genotóxicos micronucleogénicos. Los valores de EPC/1,000 ET no cambiaron en los diferentes tiempos, pero se pudo observar que en los animales jóvenes fueron más altos (25.6 ± 13.2) comparado con los viejos (12.0 ± 7.3). Es importante recordar que los EPC son los eritrocitos jóvenes o inmaduros, los cuales permanecen en circulación las primeras 24 a 48 h, por lo que son un parámetro para determinar si la médula ósea está funcionando correctamente. Si se observara disminución de estas estructuras, el significado es mitodepresión, debido probablemente a que la dosis del medicamento resultó citotóxica y esto a su vez influye en la producción de EMN.

El hallazgo de las diferencias de EPC entre animales jóvenes y viejos concuerda con lo descrito en otros trabajos (Zúñiga, *et al.*, 1996a; Zúñiga-González, *et al.*, 1998). En el caso de la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), cuando su sistema reticuloendotelial ya se encuentre en estado maduro comenzaría a retirar de la circulación la mayoría de los EMN espontáneos, entre otras anormalidades, disminuyendo con esto la probabilidad de que éstos pudieran ser observados en un frotis de sangre periférica (Zúñiga-González, *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la disminución de EMN y EPC en la ardilla gris si está relacionada con la edad, así como sucede también en otras especies (Schalm, *et al.*, 1964; Mitruka, *et al.*, 1981; Zúñiga, *et al.*, 1996a; Zúñiga, *et al.*, 1996b; Zúñiga-González, *et al.*, 2000), en donde el sistema reticuloendotelial madura 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 y otras anomalías. Sin embargo, en este estudio se observó que los animales viejos también incrementan significativamente los valores de EMN en sangre periférica. Con base en estos 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 así, obtener el aumento significativo en una prueba. Finalmente, dado a que en este trabajo no fue posible tener las edades de las ardillas, la recomendación que sugerimos es que las ardillas que sean empleadas para futuros experimentos, tengan pesos corporales similares (entre 125 y 264 g).

CONCLUSIONES.-

1. La administración consecutiva de colchicina por tres días permitió concluir que la respuesta a micronucleogénicos en esta especie puede diferir debido al estado de madurez del sistema reticuloendotelial de cada individuo, el cual está relacionado a su vez con el crecimiento y desarrollo de las ardillas.
2. Tanto las ardillas jóvenes como las viejas respondieron al agente micronucleogénico, produciendo incremento estadísticamente significativo de EMN en las diferentes horas de estudio, por lo tanto, este organismo puede ser utilizado en estudios para exposiciones subagudas, al observar acumulación de EMN.
3. La proporción de los valores de EPC en 1,000 ET no disminuyó en las diferentes horas de estudio, lo que indica que el medicamento no resultó citotóxico a esta dosis. Sin embargo, se pudo apreciar que en los animales jóvenes fueron más altos (25.6 ± 13.2) comparado con los viejos (12.0 ± 7.3).
4. Con los datos obtenidos en este estudio se corrobora que el número de EMN de la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), así como en otras especies, disminuye por la edad.
5. Es conveniente que para estudios futuros se trabaje con ardillas de pesos similares para obtener valores más homogéneos de EMN.

BIBLIOGRAFÍA.-

1. Becker TM. Manual Práctico de Quimioterapia del Cáncer. Salvat. Barcelona España. 1985; 1-16.
2. Beula KDH, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res.* 1991; 263: 185-196.
3. 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.
4. 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.
5. Burgeot T, His, E, Galgani, F. The Micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res.* 1995; 342: 125-140.
6. 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.
7. Córdoba D. Toxicología. 4ª ed. Manual Moderno. Bogotá. 2001; 197-213.
8. De Vita VT, Hellman SJr, Steven A, Rosenberg MD, Oncology: Principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Multimedia 1997.
9. Encarta® 98 Enciclopedia Microsoft®. © 1993-1997 Microsoft Corporation.
10. Fernandez M, l'Haridon J. Effects of light on the cytotoxicity of benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt. *Environ Mol Mutagen.* 1994; 24: 124-136.
11. Gismondi E. Todo sobre la ardilla. de Vecchi. Barcelona. 1995: 11-35; 79-115.

12. 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.
13. 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.
14. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate, M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 12: 241-247.
15. 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.
16. Hayashi M, Kodama Y, Awogi T, Suzuki T, Asita A, Sofuni T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat Res.* 1992; 278: 209-213.
17. 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.
18. Heddle J, Hite M, Kirkhart B, Mavourmin K, MacGregor 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.
19. 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.
20. Hellman S, Volkes EE. Advancing current treatments for cancer. *Sci Am.* 1996; 275: 84-89.

21. Hillman RC, Finch CA. El Eritrocito. 5ª ed. Manual Moderno. México. 1987; 1-35.
22. Hillman RC, Clement AF, Boggs DR, Winkelstein A. Manual de Hematología. 8ª ed. Manual Moderno. México. 1990; 317.
23. Iway M, Arimura H. Effect of multiple dosing of phenaceting on micronucleus induction: a supplement to the International and Japanese Cooperative Studies. *Mutat Res.* 1990; 245: 11-14.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Lähdetie J. Micronucleus induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res.* 1983; 120: 257-260.
28. Lazo LS, Larner JM. Individual Antineoplastic Drug. En: Brody TM, Larner Jm, Minneman KP, Neu HC. Human Pharmacology. 2ª ed. Mosby. Baltimore. 1994; 575-590.

29. Lee CF, Marzin D, Erb F. Genotoxic activity of three carcinogens in peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl*. *Mutat Res.* 1992; 283: 157-160.
30. Ley de protección de los animales. Publicada en El Diario de la Federación del 7 de Enero de 1981. Capítulo II: artículo 8-10. Asociación activa para la supresión de crueldad hacia los animales, A.C.
31. Ma TH, Xu Z, Xu Ch, McConnell H, Arreola GA, Zhang H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of enviromental pollutan. *Mutat Res.* 1995; 334: 185-195.
32. MacKey BE, MacGregor JT. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutat Res.* 1979; 64: 195-204.
33. Martin RH, Hildebrand K, Yamamoto J, Rademaker A, Barnes M, Douglas G, Arthur K, Ringrose T, Brown IS. An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutat Res.* 1986; 174: 219-225.
34. McVan BF. Índice de medicamentos para la consulta de médicos, odontólogos y farmacéuticos. Manual Moderno. México. 1995; 399, 400.
35. Mettler M. Ardillas. Tikal. Barcelona. 1996; 139
36. 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.
37. Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in experimental animals and normal humans. 2ª ed. Masson Publishing. New York. 1981; 31-62.

38. Montoya Cabrera MA. Toxicología Clínica. Francisco Méndez Cervantes. México, D.F. 1992; 7-16
39. Novalés CX, Amato MJ. Sistema Linfohemático. 1ª ed. Limusa. México, D.F. 1993; 57-124, 160-165.
40. 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.
41. Perera FP, Hemminki K, Gryzbouska E, Motykiewicz G, Michalska J, Sautella RM, Young TL, Dickey C, Brandt-Ranf P, De Vivo I, Blaner W, Tsaili WY, Chorazy M. Molecular and genetic damage in human from environmental pollution in Poland. *Nature.* 1992; 360: 256-258.
42. Pratt WB, Riddon RW, Ensminger WD, Maybaum J. The Anticancer Drugs. 2ª ed. Oxford University Press. New York. 1994: 336.
43. Ramírez-Muñoz MP, Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Portilla E, García-Martínez D, Ramos A, Cantú JM, Sánchez-Corona J. Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Lab Animal Sci.* 1999; 49: 418-420.
44. Rodríguez-Ariza A, Nieves A, Navas JI, Dorado G, López-Barea J, Pueyo C. Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 19: 112-124.
45. Rudek Z, Rozek M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutat Res.* 1992; 298: 25-29.

46. Ruíz EF, Valtierra RE, Lecona SU, Prez AB, Ma TH. Tradescantia-micronucleus (Tra-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and *in situ* monitoring. *Mutat Res.* 1992; 270: 45-51.
47. 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.
48. 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.
49. Schalm OW. Eritrocitos: producción, función y destrucción. En: Hematología Veterinaria. 1ª ed. Uteha. México, D.F. 1964; 83-222.
50. Schlegel R, MacGregor TJ, Everson RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res.* 1986; 46: 3717-3721.
51. 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.
52. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975; 31: 9-15.
53. SEMARNAP. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural, 1997-2000 México. 1997, SEMARNAP-INE, 17-24, 80.
54. Sharma AK, Sharma A. Chromosome techniques theory and practice. 3ª ed. Butterworth & Co. Boston. 1980; 711.

55. Shuilin H, Baker RSU. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen*. 1989; 14: 1-5.
56. Shull WJ. Late radiation responses in man: current evaluation from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res*. 1983; 3: 231-239.
57. Stopper H, Peckan R, Schiffmann D. 5-Azacytidine induces micronuclei and morphological transformation of Syrian hamster embryo fibroblast in the absence of unscheduled DNA synthesis. *Mutat Res*. 1992; 283: 21-28.
58. Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 22: 101-106.
59. Torres-Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res*. 1998; 413: 277-281.
60. 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: 212-217.
61. Walmmann P, Pivcevi B, Muller WEG, Zahn RK, Kurelec B. Increased genotoxic of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutat Res*. 1995; 342: 113-123.
62. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Hematology. 4^a ed. McGraw-Hill. USA. 1990; 308-698.
63. Yamamoto K, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res*. 1980; 71: 127-131.

64. Zúñiga González GM. Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotóxicos mediante el conteo de micronúcleos. Tesis de Grado, Doctorado en Ciencias de la Salud orientación Biomédicas, Universidad de Guadalajara. México. 1996.
65. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res.* 1996a; 369: 123-127.
66. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Delgado-Lamas JL, De Loza-Saldaña R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res.* 1996b; 361: 107-112.
67. Zúñiga-González G, Ramírez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res.* 1998; 413: 187-189.
68. 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.
69. 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 animal including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res.* 2001; 494: 161-167.