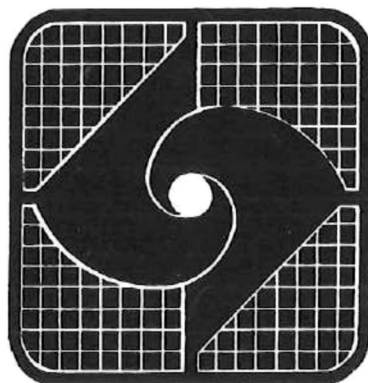




**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**"GENOTOXICIDAD EN CELULAS EPITELIALES
DEL TUBO DIGESTIVO DE Mytilus californianus
(Conrad, 1837) DE LA BAHIA TODOS SANTOS"**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA
LORENA CHAVEZ ROSAS

ENSENADA, B. C.

NOVIEMBRE DE 1992.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

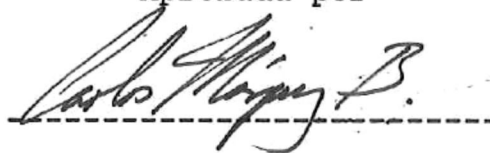
FACULTAD DE CIENCIAS

GENOTOXICIDAD EN CELULAS EPITELIALES DEL TUBO DIGESTIVO DE
Mytilus californianus (Conrad 1837) DE LA BAHIA TODOS SANTOS.

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA:

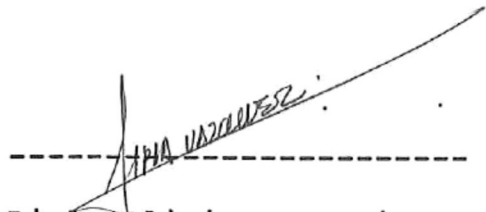
LORENA CHAVEZ ROSAS

Aprobada por



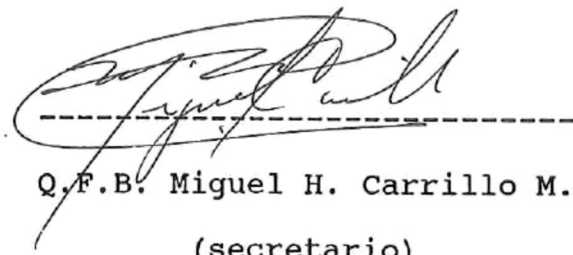
M.C. Carlos Márquez Becerra

Presidente del jurado



Biol. Olivia M. Tapia V.

(Vocal)



Q.F.B. Miguel H. Carrillo M.

(secretario)

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo fué realizado en laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la U.A.B.C. A través de su proyecto principal denominado " Detección de Agentes Mutagénicos en las Costas de Baja California " el cual dirige el C a Dr. Carlos Márquez Becerra.

Este proyecto ha dado origen a trabajos como este, al mismo tiempo que ha avanzado cumpliendo con objetivos propuestos y así dar pie al desarrollo de futuras investigaciones. Paralelamente se han apoyado trabajos en el área de la citogenética humana así como de peces y moluscos.

Agradezco el apoyo otorgado por parte de la Dirección General de Investigación y Postgrado de la U.A.B.C. el cual consistió en una Beca Tesis recibida durante 3 semestres.

Así también, por el apoyo DGICSA, SEP (convenio No. C88-01-0413); No.de registro: 880556).

DEDICATORIA

A mis padres: Sr. Carmelo Chávez Zeferino y
Sra. Dominga Rosas de Chávez.

A mi esposo: Salvador Barrera Hernández

Con cariño a: Omar , Beny
Jesús, Vanessa y Paola.

A Danielita.

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis C. a Dr. Carlos Márquez Becerra por haber despertado mi interés en el área a través de las clases de genética y evolución. Por haber apoyado el trabajo de servicio social que en su momento representó un escalón hacia mi formación profesional y a raíz del cual surgió la inquietud para la realización de este trabajo.

Gracias por este segundo apoyo, gracias por las experiencias académicas, por las críticas y consejos.

Al M.C. Faustino Camarena Rosales, director de la Facultad de Ciencias; a la M.C. Irma Rivera Garibaldi, subdirector académico y al Biólogo Elias Torres B., subdirector administrativo. Por el apoyo brindado a la fecha al laboratorio de Genética de esta Facultad.

Al C. a M.C. Guillermo Bojórquez Rangel por su compañerismo y ayuda incondicional en el desarrollo este trabajo. Por compartir sus conocimientos, por sus buenos consejos.

Al Oc. Salvador Galindo Bect, por su interés mostrado en este trabajo así como por el apoyo brindado al inicio del mismo.

A los C. a M.C. Carmen Paniagua Chávez y Miguel Angel del Río por su desinteresada ayuda y orientación en el desarrollo del análisis estadístico.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A mis padres

Por haberme inculcado el amor al estudio y que en vida nos han dejado a cada una de sus hijas la mejor herencia que pudieramos recibir. Por sus esfuerzos y sacrificios.

A mi esposo Salvador Barrera H. por su apoyo, amor y comprensión en los momentos difíciles. También por sus acertadas críticas.

A mis hermanas y cuñados; por ayudar siempre a la menor de sus hermanas.

RESUMEN

Se evaluó la genotoxicidad en células epiteliales del tubo digestivo del mejillón *Mytilus californianus* colectados en cuatro zonas: Km.105 carr. Tij-Ens., Rompeolas y Punta Banda de la Bahía Todos Santos y una cuarta ubicada en el Ejido Eréndira; esta última considerada como una zona pristina.

Se colectaron un total de 80 organismos en los meses de diciembre de 1989 y abril de 1990. Con el objetivo de analizar las frecuencias de aberraciones cromosómicas además de los siguientes parámetros en núcleo interfásico: a) Frecuencia de micronúcleos MN b) Frecuencias de núcleos heteroplicnóticos, reticulados y rupturas.

En el primer muestreo se observó cierta relación entre frecuencias altas de aberraciones nucleares con respecto a las zonas más contaminadas, así mismo el bajo índice mitótico presentó variación interindividual y en ocasiones se vió abatido. Las poblaciones del Ej. Eréndira y el Km. 105 presentaron frecuencias bajas de aberraciones.

El bajo índice mitótico no permitió el estudio de aberraciones cromosómicas.

En el segundo muestreo ocurrió lo mismo con el índice mitótico. No es clara la relación entre el grado de contaminación en las zonas y las frecuencias de aberraciones encontradas; lo cual puede ser atribuible a una gran cantidad de factores fisicoquímicos y biológicos.

Como estudio adicional se comparó el efecto del choque hipotónico en la prueba de micronúcleos lo cual revela diferencias significativas.

INDICE

Introducción.....	1
Ciclo celular.....	12
Antecedentes.....	17
Bioacumulación de agentes químicos en <i>M. californianus</i> de la Bahía Todos Santos.....	17
Efecto de los contaminantes a nivel citogenético.....	19
Objetivos.....	23
Area de estudio.....	24
Metodología.....	26
Resultados.....	38
Organismos del primer muestreo.....	41
Organismos del segundo muestreo.....	52
Discusiones.....	62
Choque hipotónico.....	63
Colchicina.....	66
Indice mitótico.....	67
Aberraciones nucleares.....	68
Primer muestreo.....	70
Segundo muestreo.....	71
Conclusiones.....	75
Recomendaciones.....	77
Literatura citada.....	78
Anexos.....	86

INTRODUCCION

El mejillón californiano *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) es uno de los invertebrados más comunes a lo largo de las costas de Baja California. Generalmente se le encuentra formando densas colonias en el intermareal rocoso; precisamente en zonas expuestas a la gran actividad del oleaje.

Mytilus californianus pertenece a la clase Bivalvia del Phylum molusca. Son organismos filtroalimentadores de detritus orgánico y plancton; principalmente dinoflagelados.

Su distribución es amplia y comprende desde las Islas Aleutianas en Alaska, hasta la región sur de Baja California (Harderlie y Abbott, 1980).

Las poblaciones de mejillones son considerardas como una alternartiva en la producción de alimento altamente nutritivo y de bajo costo (De la Garza - Montano, 1987). No obstante su importancia económica no debe ser limitada a este aspecto, ya que el papel ecológico de estas poblaciones es el de consolidar microambientes difícilmente sustituibles y que son explotados por una diversidad de organismos.

El mecanismo de alimentación del mejillón californiano es el mismo que la mayoría de los moluscos bivalvos y se lleva a cabo cuando el organismo se encuentra sumergido;

entonces abre las valvas ligeramente y genera corrientes por medio de cilios, moviendo así el agua hasta hacerla pasar por las branquias. Estos órganos sirven de filtros que atrapan el alimento que posteriormente será transportado en el mucus, hasta los palpos y después a la boca.

Su capacidad filtradora se ha estimado entre los dos y tres litros de agua por hora, durante la alimentación (Harderlie y Abbott, 1980).

Los mejillones captan además del alimento partículas extrañas; muchas de las cuales son contaminantes como metales pesados, elementos transuránicos, hidrocarburos de petróleo y halogenados; tendiendo a bioacumularlos en niveles mayores que los del medio circundante (Goldberg et al., 1978). Esta capacidad de bioacumulación de los bivalvos ha sido considerada en algunos países, importante para medir el grado de contaminación del ambiente y en torno a esto se han generado programas de monitoreo que emplean especies bioindicadoras de contaminación; tal es el caso del desarrollado por Goldberg et al., (1978) denominado "*Mussel Watch*" mismo que ha estimulado la formación de nuevos programas de naturaleza similar en el Mediterráneo, Chile y Turquía, por citar algunos ejemplos.

Este programa ha rendido reportes anuales sobre los niveles de bioacumulación en mejillones a lo largo de las costas de E.U. en el océano Pacífico, Golfo de México y

oceanó Atlántico.

A pesar de los logros obtenidos acerca de las concentraciones de contaminantes presentes en los organismos analizados, los autores plantean objetivos a futuro que intenten describir el efecto biológico de los contaminantes, entre los cuales se menciona la necesidad de indicadores fisiológicos de contaminación además de la aplicación de la prueba de Ames para mutagénesis y carcinogénesis (Goldberg *et al.*, 1978).

Los datos generados en este rubro, han sido destinados a la protección de la salud pública; estableciendo los máximos permisibles de contaminantes en tejidos de peces y mariscos para el consumo humano.

En Estados Unidos el organismo encargado de dicha labor es la Administración de Alimentos y Fármacos (F.D.A.).

Por otro lado, aunque se ha cuestionado el efecto que pudieran tener los contaminantes sobre los organismos marinos; aún se es incapaz de definir las consecuencias ambientales para cualquier nivel de bioacumulación en alguna especie determinada (Peddicord, 1984).

Ciertos agentes químicos, como pesticidas y disolventes orgánicos tienen la capacidad de alterar el material genético de los organismos expuestos a ellos; es decir, actúan como agentes mutagénicos ya sea aisladamente o en conjunto, provocando dos tipos de alteraciones

básicas:

a)- Mutaciones génicas: Por sustitución, eliminación y adición de nucleotidos.

b)- Mutaciones cromosómicas: Por rearrreglos cromosómicos y alteraciones de número (tabla 1).

Este tipo de mutaciones son consideradas como fuente básica (mas no única) de variabilidad genética y ocurren con una frecuencia muy baja, sin dirección y al azar, cuya importancia para la evolución es en el sentido de que no están orientadas con respecto a la adaptación (Ayala y Kiger, 1984).

No obstante en la medida que los mutágenos son introducidos en la biosfera, estos incrementan la tasa mutacional, generando aquellas mutaciones consideradas como dañinas (letales y subletales), puesto que no son favorecidas por la selección natural con respecto a un ambiente específico.

Cabe añadir que algunos procesos metabólicos como los de desintoxicación (destrucción de agentes nocivos por células y tejidos) pueden conducir a la degradación o modificación de sustancias ambientales que en un momento dado pudieran ser tóxicas y convertirlas en inócuas.

Sin embargo, es posible la conversión de sustancias inócuas en derivados mutagénicos en el transcurso de su biotransformación (Drake y Flame, 1972).

TABLA I
CLASIFICACION DE LAS MUTACIONES

MUTACION	
I PUNTUAL O INTRAGENICA: CON CAMBIOS INTRAGENICOS LOCALES DE 4 TIPOS	II CROMOSOMICA
1) SUSTITUCION DE PARES DE NUCLEOTIDOS.	A ESTRUCTURAL CON PRESENCIA DE MUTACIONES INTER E INTRACROMOSOMICAS:
2) DELECCION.	1) DELECCION.
3) INSERCCION.	2) DUPLICACION.
4) REORDENAMIENTO.	3) INVERSION.
	4) TRANSLOCACION.
	B DE NUMERO:
	1) POLIPLOIDIA,
	2) HAPLOIDIA.
	3) ANEUPLOIDIA,

Como una manera de evitar confusión en el empleo de algunos términos propios de la genética, es pertinente definir aquellos que serán continuamente citados a lo largo del presente estudio.

Los términos mutagénesis y carcinogénesis son conceptos muy precisos a pesar de que se refieren a eventos muy complejos; de ahí que se define como mutágeno al agente capaz de incrementar la tasa de mutación y conocemos como carcinógeno al agente capaz de incrementar la tasa de aparición de un tumor.

Sin embargo, el término genotoxicidad es un concepto menos preciso el cual etimológicamente significa "toxicidad para el genoma". Una razón para emplear este término es que hace hincapie al hecho de que los ataques al genoma pueden originar diferentes efectos como: Mutagénesis, inducción de fagos, muerte celular, inhibición de la división celular, rompimiento cromosómico y rompimiento de microtúbulos.

Cada uno de estos efectos pueden ser considerados como puntos terminales para estimar genotoxicidad. Sin embargo es cierto que hoy en día no existe un concenso para su estimación (Hofnung y Quillardet, 1984).

Por otra parte, el problema referente al efecto biológico de los contaminantes ha sido abordado desde varios puntos de vista: Principalmente tratando de evaluar

el " stress ambiental " haciendo un enfoque en las consecuencias sobre el proceso reproductivo (Straughan, 1977; Bayne et al., 1979; Bayne et al., 1981) y la sensibilidad de juveniles (Nelson et al., 1988).

Así mismo se ha evaluado el efecto a nivel citogenético mediante estudios relacionados con las aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas [ICH] (Dixon, 1982; Dixon y Clarke, 1982; Harrison y Jones, 1982; Al-Sabti y Kurelec, 1985; Brunetti et al., 1986) y aunque han sido propuestos como parámetros relevantes en la evaluación de sustancias genotóxicas; presentan ciertas limitantes como lo es el bajo valor estadístico que ofrecen debido al pequeño número de células que pueden ser examinadas (Dixon y Clarke, 1982; Heddle et al., 1983 y Márquez - Becerra, 1987).

Sin embargo otra manera de estimar el efecto genotóxico de las sustancias mutagénicas; es aquella en la cual se detecta el daño al material genético a través de la evaluación de las células interfásicas.

La prueba de micronúcleos desarrollada por Von Ledebur y Schmid (1973), Schmid (1975) y Heddle (1983) ha demostrado ser un sensible indicador de daño cromosómico y se ha presentado como una alternativa para la evaluación de genotoxicidad en el medio marino (Majone et al., 1987; Márquez- Becerra, 1987; Brunetti et al., 1988; Majone et al., 1988).

Los micronúcleos (MN) fueron descritos por Jolly en 1905 (Brunetti et al., 1988) como pequeños cuerpos de ADN los cuales se pueden encontrar cerca del núcleo principal durante la interfase, como consecuencia de rompimientos cromosómicos o disfunciones del aparato mitótico. Esto se debe a que en la etapa de anafase, los cromosomas acéntricos, fragmentos cromosómicos y cromosomas con centrómero inactivado no se segregan normalmente y no es sino hasta culminada la telofase que se manifiestan como uno o mas núcleos secundarios en una u otra célula (Von Ledebur y Schmid, 1973). (fig.1)

Los primeros estudios realizados in vivo fueron basados en la identificación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) de células de médula ósea de ratón, este ensayo es ampliamente conocido dada su gran utilidad

Hoy en día su aplicación es tan amplia que se han realizado estudios tanto in vivo como in vitro en células de diversas especies de plantas (Vicia faba, Tradescantia sp. etc.) y animales (cricetos, monos, ratas, etc.) además del ser humano. Especies en las que se ha comprobado el efecto citogenético de una amplia lista de agentes mutagénicos y carcinogénicos.

De acuerdo con Heddle et al., (1983) esta prueba ofrece además de su simplicidad y rapidez las siguientes ventajas:

- a) - Los micronúcleos pueden ser observados a través

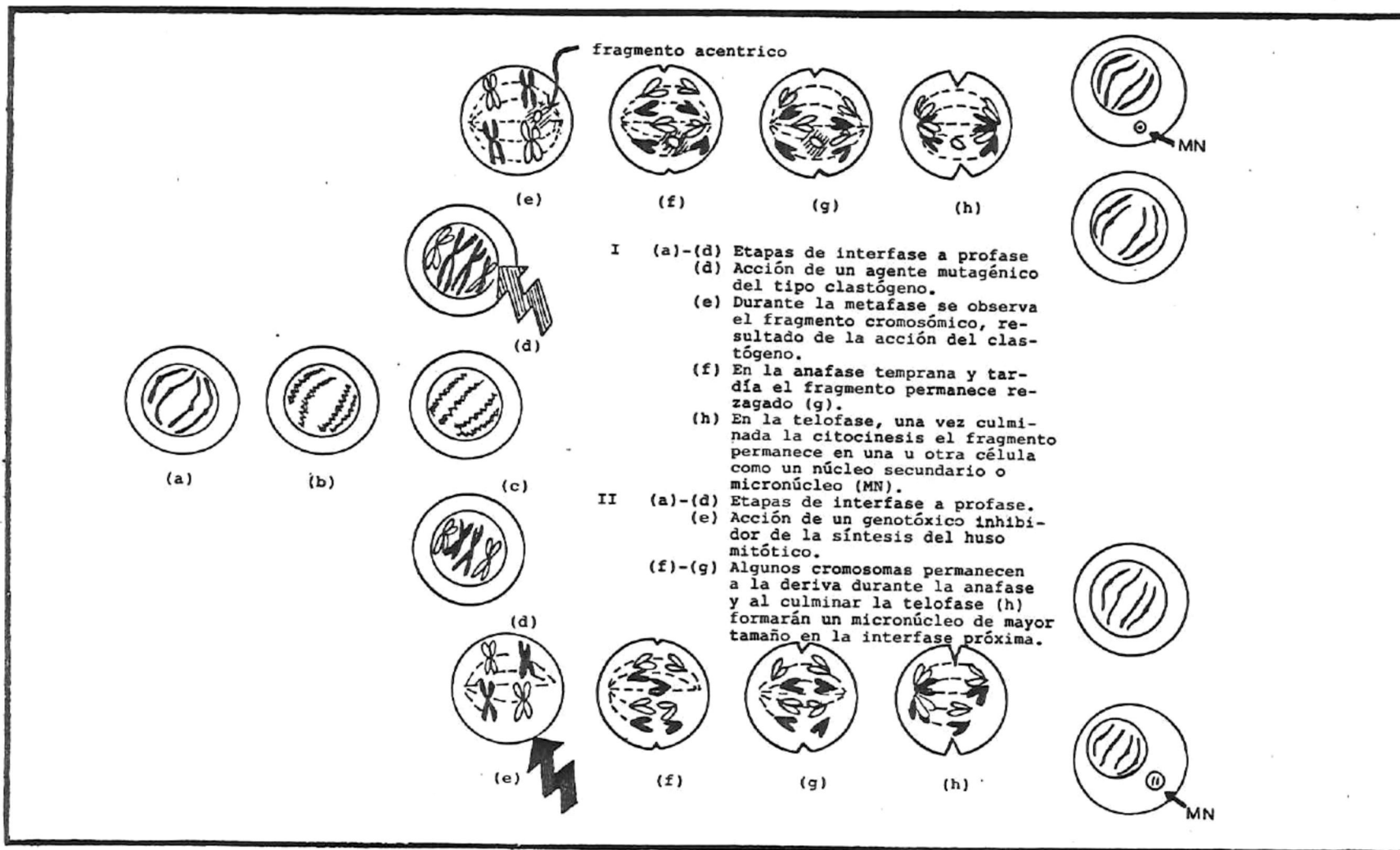


Figura 1. Mecanismo de formación de los micronúcleos.

I - Acción de un mutágeno del tipo clastógeno.

II- Acción de un genotóxico perturbador del huso acromático.

del ciclo celular.

b) - El número de células evaluables es ilimitado.

c) - No se requiere de cariotipo, ni de células en metafase.

d) - Los micronúcleos originados durante la división celular persisten al menos hasta la interfase próxima, de tal forma que el tiempo requerido para preparar la muestra resulta ser menos crítico.

e) - No se requiere de ningún agente inhibidor de la síntesis del huso mitótico.

f) - El significado de los micronúcleos es comparativamente mas claro que otras pruebas citogenéticas; tales como hendiduras cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

g) - Se detecta con esta prueba, disfunciones o alteraciones del aparato mitótico.

Además mediante la comparación de sus diámetros es posible discernir si los micronúcleos fueron inducidos por clastógenos o bien, por genotóxicos inhibidores de la síntesis del huso acromático " *Spindle poisons* " (Yamamoto y Kikuchi, 1980).

Sin embargo dentro de las limitantes es posible citar entre ellas: La imposibilidad de detectar daños provocados por agentes que no rompen al cromosoma (mutaciones génicas); así como aquellas aberraciones que involucren rearrreglos cromosómicos v.gr. inversiones y traslocaciones.

Además de los micronúcleos, existen otros tipos de aberraciones nucleares cuyo análisis es complementario y comparable en utilidad al de las aberraciones cromosómicas; tal es el caso de las heteropicnosis, cariorrexis y apoptósis.

La frecuencia de este tipo de aberraciones en núcleos interfásicos ha sido empleada como parámetros importantes en la evaluación de genotoxicidad; así mismo se les ha relacionado con la proliferación de tumores y cánceres en los tejidos afectados; o bien con la muerte celular (Stewart, 1977; Wyllie *et al.*, 1980; Goldberg y Chidiac, 1986).

Ahora bien, dada la importancia del análisis en núcleo interfásico; cabe detallar el proceso del Ciclo Celular.

CICLO CELULAR

La vida celular se inicia con la formación de una célula como resultado de la división de una célula madre y culmina con la formación de células hijas (división) o bien, con la muerte o especialización celular.

A esta serie de fenómenos entre los cuales se involucra la distribución de material genético en las células hijas, se le ha denominado ciclo celular (fig. 2).

En el se distinguen morfológicamente dos grandes etapas:

a) Interfase

b) Mitosis

La mayor parte del ciclo corresponde al período de interfase y es aquí donde ocurren fenómenos bioquímicamente importantes como el período de síntesis (S); durante el cual el material genético se duplica. Este período es precedido por un período G1 ("gap": hueco) y seguido por un período G2. Mismos que se caracterizan por la intensa actividad metabólica y crecimiento celular.

En el período de mitosis (fig. 3) el material genético se condensa formando cromosomas, los cuales se separan para dar origen a dos nuevas células. Este fenómeno es de corta duración por lo que es mas conveniente el análisis en núcleo interfásico.

En la célula interfásica eucariótica es posible la observación del núcleo como tal, dentro de él están incluidos los cromosomas en forma de fibras de

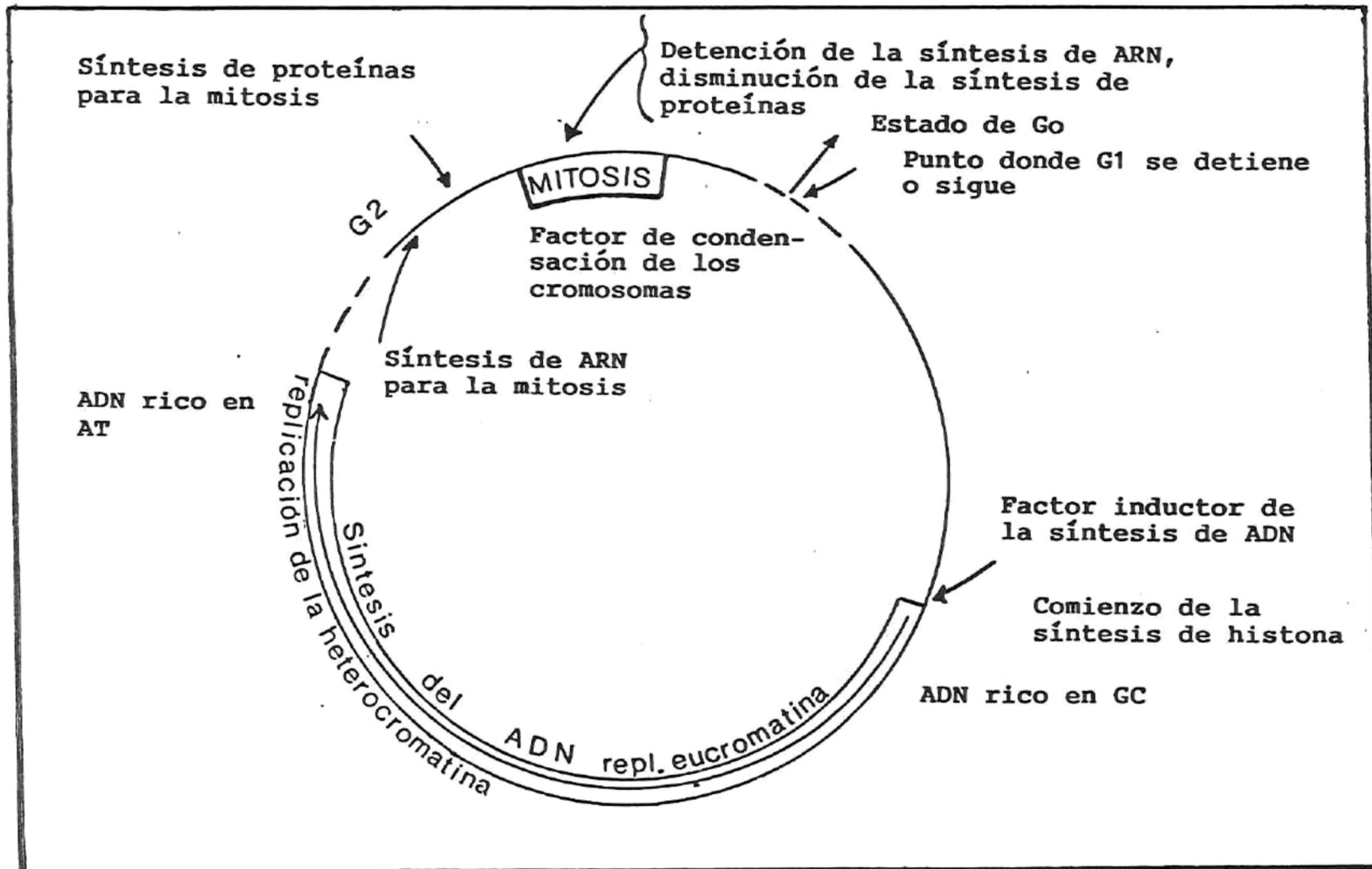


Figura 2. Algunos procesos moleculares mas importantes durante el ciclo celular. (Tomado de De Robertis y De Robertis, 1984).

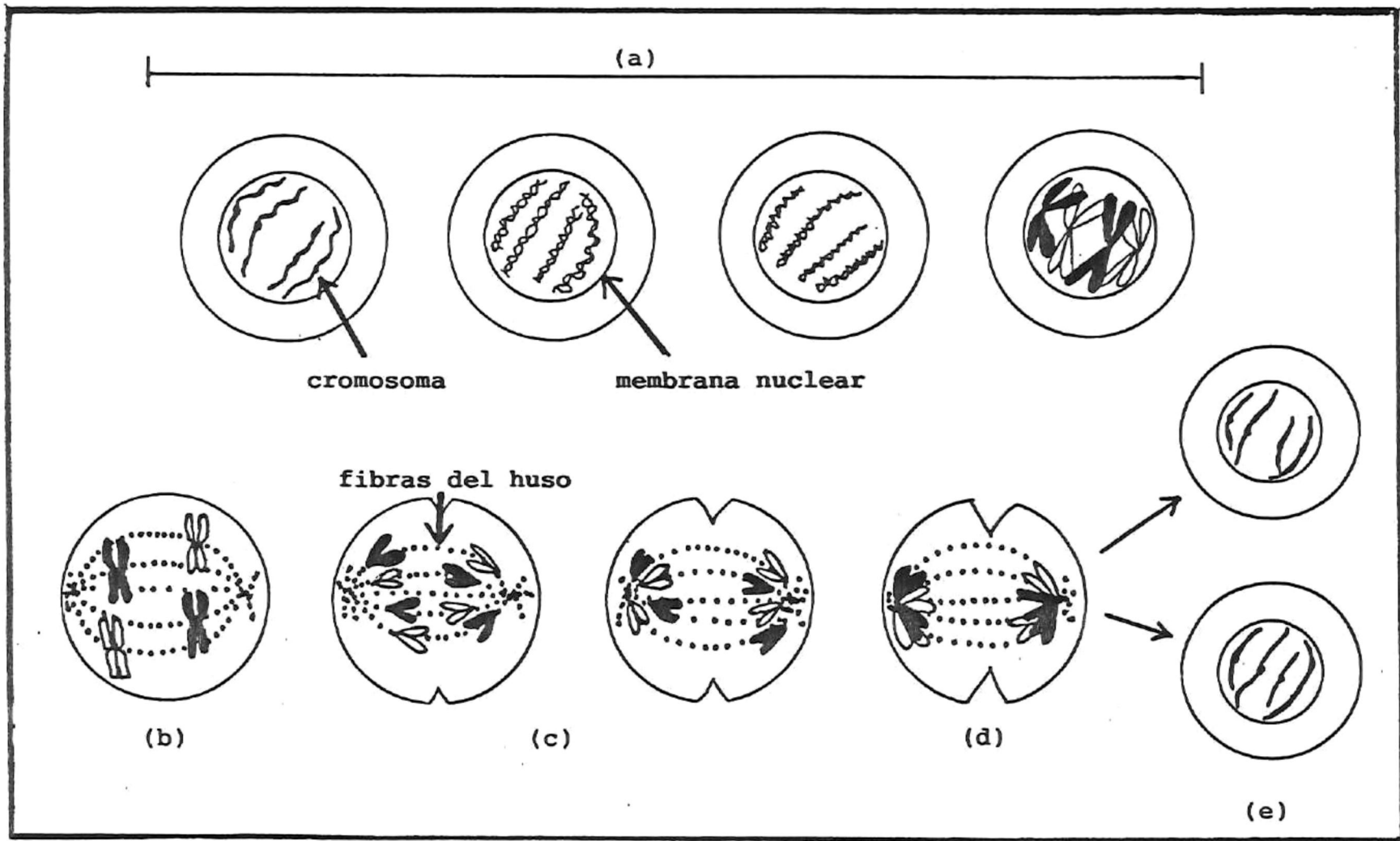


Figura 3. Las cuatro etapas de la mitosis.

(a) Profase (b) Metafase (c) Anafase (d) Telofase (e) Celulas hijas en interfase.

nucleoproteínas muy laxas que en conjunto reciben el nombre de cromatina, la cual está bien delimitada por una membrana o envoltura nuclear compleja.

La condensación del material cromatínico recibe el nombre de picnósis, la cual se puede manifestar parcialmente generando regiones heteropicnóticas dentro del núcleo. Esta aberración nuclear ha sido descrita por algunos autores como la evidencia de genes inactivados dentro del genoma (Márquez - Becerra¹, com. pers.)

Por otra parte, los núcleos reticulados o cariorréticos *Karyorrhetic nuclei* son producto de una condensación excesiva que culmina en una lesión destructiva del núcleo, la cual parece dividirlo en fragmentos hipercromáticos. En estos casos la envoltura nuclear no es visible y los núcleos son claramente distinguibles de los normales (Wyllie, 1979). El índice cariorrético es empleado en la evaluación de genotoxicidad y se ha considerado evidencia de muerte celular.

Existe también el término apoptósis propuesto por Kerr et al., (1972) (citado en Wyllie et al., 1980) que describe una serie de eventos precedentes a la muerte celular que tienen por característica la formación de cuerpos apoptóticos (vacuolas) las que también son indicadores del contacto con genotóxicos y agentes carcinogénicos

¹ Carlos Márquez-Becerra F.C./U.A.B.C., AP #1880, Ensenada B.C.

(Wargovich et al., 1983; Ronen y Heddle, 1984).

Sin embargo dicho fenómeno ha sido relacionado en gran parte con la regulación homeostática de los tejidos adultos o bien, con la sustitución de células muertas (o degeneradas) por células nuevas durante el desarrollo embrionario normal. A diferencia del proceso necrótico el cual no es determinado por factores intrínsecos de la célula; sino que se debe a perturbaciones ambientales violentas (Wyllie et al., 1980).

Por otra parte, a pesar de las diferencias entre los procesos apoptóticos y necróticos (que revela la microscopía electrónica) los términos picnósis y cariorrexis (reticulaciones) pueden ser legítimamente empleados en la descripción de ciertas fases de la evolución de ambos cuando se analiza mediante microscopía de campo claro (Wyllie et al., 1980).

La finalidad de este trabajo consistió en evaluar el impacto de los genotóxicos ambientales sobre poblaciones de células, obtenidas del epitelio del tubo digestivo de mejillones *Mytilus californianus*.

Para tal fin se analizaron micronúcleos y otras aberraciones nucleares como parámetros significativos de genotoxicidad.

ANTECEDENTES

BIOACUMULACION DE AGENTES QUIMICOS EN *Mytilus californianus* DE LA BAHIA TODOS SANTOS

En los años sesentas se dá el florecimiento de la conciencia ecológica, lo cual convierte a la contaminación marina en un tópico de gran interés y esto a su vez genera el auge de estudios sobre bioacumulación; la que en sentido amplio incluye las mediciones de contaminantes sin considerar la fuente o mecanismo para su introducción (Peddicord, 1984).

Se acuñan además los términos: Bioconcentración y bioamplificación. El primero se refiere al proceso mediante el cual los agentes químicos entran en los organismos acuáticos a través del tejido epitelial y branquias, directamente del agua (Brungs y Mount, 1978). El segundo término considera el mecanismo mediante el cual las concentraciones de los residuos bioacumulados son incrementados a través de las cadenas tróficas (Macek et al., 1979).

Para la costa noroccidental de la Baja California, Suarez Vidal y Acosta Ruiz (1976b) determinaron la distribución de Cu y Zn en *Mytilus californianus* encontrando valores bajos, si son comparados con otras áreas. Sin embargo de ninguna manera queda excenta de contaminación por metales pesados.

Así también, los mismos autores (1976a) encontraron que la distribución de las concentraciones de DDT en el mejillón, no se apega a un patrón definido y aunque los valores tienden a decrecer, la persistencia de dicho contaminante en el medio marino será de varios años.

Gutierrez - Galindo et al., (1983a) encontraron que aunque la variación temporal y espacial de pesticidas organoclorados; examinados en *Mytilus californianus* no se apega a un patrón definido; los niveles de DDT y sus metabolitos, fueron mayores comparados con el resto de los organoclorados.

Ellos detectaron valores máximos en vísceras y mínimos en manto y músculo. Los niveles de DDT total detectados, no rebasan los máximos permisibles para el consumo humano (5mg/Kg) establecido por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA por sus siglas en inglés) en 1969.

También establecen que la razón de Σ DDT/BPC (bifenilos policlorados) fue menor a 1 en el área de estudio (Gutierrez - Galindo et al., 1983b).

Por último en 1988, Reynoso - Nuño y Jorajuria analizaron concentraciones de metales pesados en poblaciones autóctonas del mejillón *M. californianus* de la costa occidental de Baja California. Así mismo hicieron trasplantes de organismos procedentes de E.U.A. en Isla Todos Santos y San Quintín. Los valores encontrados

muestran que las poblaciones de mejillones de Baja California y en especial Punta Abreojos, presentan condiciones altamente pristinas.

EFEECTO DE LOS CONTAMINANTES A NIVEL CITOGENETICO

A pesar de que se ha reconocido el efecto del "stress ambiental", integrando efectos bioquímicos y citológicos para evaluar los impactos mas generales en algunas poblaciones (Bayne et al., 1979). Los trabajos concernientes al efecto de genotóxicos ambientales sobre organismos marinos han sido pocos.

Battaglia et al., (1980) sugieren que los cambios detectados en las frecuencias génicas de *Mytilus galloprovincialis*, pueden estar relacionadas al grado de contaminación en las áreas de muestreo.

Así mismo establecen que la población de dichos mejillones muestra una desviación de las expectativas Hardy-Weinberg con una deficiencia de heterocigotos debido al fuerte efecto selectivo al que están sujetos.

Dixon (1982) encuentra una elevada incidencia de aneuploidías (26%) en embriones de mejillones *Mytilus edulis*, en un puerto contaminado; en comparación con el valor para una costa abierta que fué de 8% .

En otro trabajo se observó que los niveles altos del mutágeno mitomicina C, incrementaron el intercambio de cromátidas hermanas [ICH] y de aberraciones

cromosómicas (Dixon y Clarke, 1982).

Harrison y Jones en 1982 desarrollaron un ensayo in vivo sobre intercambio de cromátidas hermanas en *Mytilus edulis* para medir el efecto de tres mutágenos: Bromodesoxyuridina (BRdUrd), mitomicina C (MMC) y metil metanosulfonato (MMS); mismo que proponen como una alternativa para los estudios de detección de genotóxicos en ambientes marinos y estuarinos.

En 1985, Al-Sabti y Kurelec, determinaron la presencia de aberraciones cromosómicas en el mejillon *M. galloprovincialis* para evaluar la calidad ambiental. Ellos presentan la posibilidad de utilizar la frecuencia de dichas aberraciones, como un parámetro relevante en la evaluación de sustancias genotóxicas presentes en el medio.

Brunetti et al., (1986) proponen que los análisis sobre intercambio de cromátidas hermanas ofrecen un sistema rápido, sensible y cuantitativo para el estudio in vivo de los efectos citogenéticos de algunos organismos marinos en los primeros estadios del desarrollo embrionario, empleando para ello *M. galloprovincialis*.

Dadas las dificultades que se han presentado en los estudios anteriores; se citan a continuación aquellos que han marcado la pauta en los estudios sobre monitoreo de genotóxicos ambientales en el medio marino; los que basados

en la prueba de micronúcleos desarrollada por Von Ledebur y Schmid a principios de los años setentas, han dado respuesta a las interrogantes citogenéticas de algunas especies acuáticas, en particular, los invertebrados marinos.

En 1987, Márquez-Becerra, propone un método para evaluar la actividad genotóxica de los contaminantes del ambiente marino, el cual se basa en el análisis de células en interfase (micronúcleos y núcleos fragmentados) a partir de epitelio branquial de mejillones.

Este método es extrapolable a otros epitelios, incluyendo el del tubo digestivo.

En el mismo año, Majone et al (1987) determinaron la frecuencia de micronúcleos inducidos por mitomicina C (MMC) en células de epitelio branquial del mejillón *M. gelloprovincialis*, e indican la conveniencia de este sistema para detectar la inducción de esta aberración nuclear en condiciones experimentales; así como para el rastreo de genotóxicos ambientales. Además debido al patrón de producción de micronúcleos, aún después del tratamiento con MMC; recomiendan este sistema como parámetro para evaluar la genotoxicidad de los contaminantes que actuaron con anterioridad al muestreo.

Posteriormente, Brunetti et al., (1988) detectaron la frecuencia de micronúcleos en tejido branquial de *Mytilus*

galloprovincialis y lo sugieren como un método rápido y sensitivo para el monitoreo de genotoxicidad ambiental.

Por último, Scarpato et al., (1990) determinaron en laboratorio, la actividad mutagénica de los compuestos vincristina y benzo(a)pireno mediante el ensayo de micronúcleos en tejido branquial de *Mytilus galloprovincialis*.

Así mismo expusieron mejillones a zonas contaminadas y los colectaron posteriormente, encontrando frecuencias de micronúcleos significativamente más altas que las del grupo control.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad genotóxica de el ambiente marino en cuatro zonas: Km.105 carr. Tij-Ens., Rompeolas y Punta Banda en la Bahía de Todos Santos y una cuarta ubicada en el Ejido Eréndira B. C. Empleando como organismo de estudio al mejillón *Mytilus californianus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar tipo y frecuencia de aberraciones cromosómicas.

b) Determinar frecuencia de micronúcleos.

c) Determinar frecuencias de rupturas, heteropicnosis y reticulaciones en núcleo interfásico.

AREA DE ESTUDIO

La estaciones de muestreo se escogieron con base a los siguientes criterios:

- a) Que en ellas existieran poblaciones de mejillones de fácil acceso.
- b) Que estuvieran influenciadas ya sea directa o indirectamente por descargas.
- c) Que se ubicaran en tres puntos representativos de la Bahía Todos Santos.

Una vez considerado lo anterior se establecieron las poblaciones de mejillones para el estudio, quedando de la siguiente manera:

- P1- Km 105 carr. Tijuana - Ensenada
- P2- Zona del rompeolas (frente al Vigía)
- P3- Punta banda (campo packard)
- P4- Ejido Eréndira (punta cabras)

En lo que al inciso (b) respecta, la única población en la cual se observó la influencia directa de una descarga fué en aquella localizada en la zona del rompeolas. En el resto de las estaciones la influencia fué indirecta.

La población de mejillones del Km 105 se encuentra ubicada frente a un hotel y se caracteriza por ser uno de los bancos de mejillones más grandes que se pueden encontrar entre las zonas de San Miguel y Punta Morro.

Por otra parte, la población de Punta Banda se

encuentra frente a un campo turístico donde los asentamientos humanos son muy pocos. Cabe hacer notar que cercana a esta zona se encuentra el estero de Punta Banda.

Por último, la población ubicada en el ejido Eréndira se caracteriza por ser una de las más grandes, localizada en una zona abierta donde los oleajes son muy intensos. En particular punta cabras (lugar específico de colecta) se localiza a aproximadamente 3 Km de distancia de la población rural.

METODOLOGIA

Se estudiaron un total de 80 organismos llevando a cabo dos colectas:

Una en diciembre de 1989 y la otra en abril de 1990.

En cada ocasión se colectaron diez organismos con una talla promedio de 7 cm + 0.79; provenientes de las poblaciones situadas en el intermareal rocoso en las siguientes estaciones de muestreo (Tabla II; fig. 4 y 5)

P1- Km 105 carr. Tijuana - Ensenada.

P2- Zona del rompeolas.

P3- Campo Packard, Punta Banda.

P4- Punta Cabras en Ejido Eréndira.

Los organismos fueron trasladados al laboratorio en agua propia del lugar de colecta. Cuando fué posible se trabajaron de manera inmediata o bien, dentro de las 24 horas posteriores. La técnica seguida fué de acuerdo a la descrita por Márquez - Becerra, (1989).

Los mejillones se mantuvieron en acuários de aproximadamente 100 L de capacidad, con aereación constante y filtración por medio de carbón activado (no se empleó filtración biológica)..

Parte de los organismos fueron inyectados con 1 ml de colchicina al 0.04% w/v en medio de Benex (tabla III).

La inyección se efectuó utilizando una jeringa hipodérmica convencional, introduciendo la aguja por medio

TABLA II
TALLA PROMEDIO EN LOS ORGANISMOS
DE ESTUDIO

ESTACION	TALLA PROMEDIO (DIC. 1989)	TALLA PROMEDIO (ABRIL 1989)
P ₁ KM. 105	X ₁ = 7.19	X ₁ = 7.33
P ₂ RONPEOLAS	X ₁ = 7.83	X ₁ = 7.31
P ₃ PUNTA BANDA	X ₁ = 7.78	X ₁ = 7.82
P ₄ EJ. ERENDIRA	X ₁ = 7.96	X ₁ = 7.17

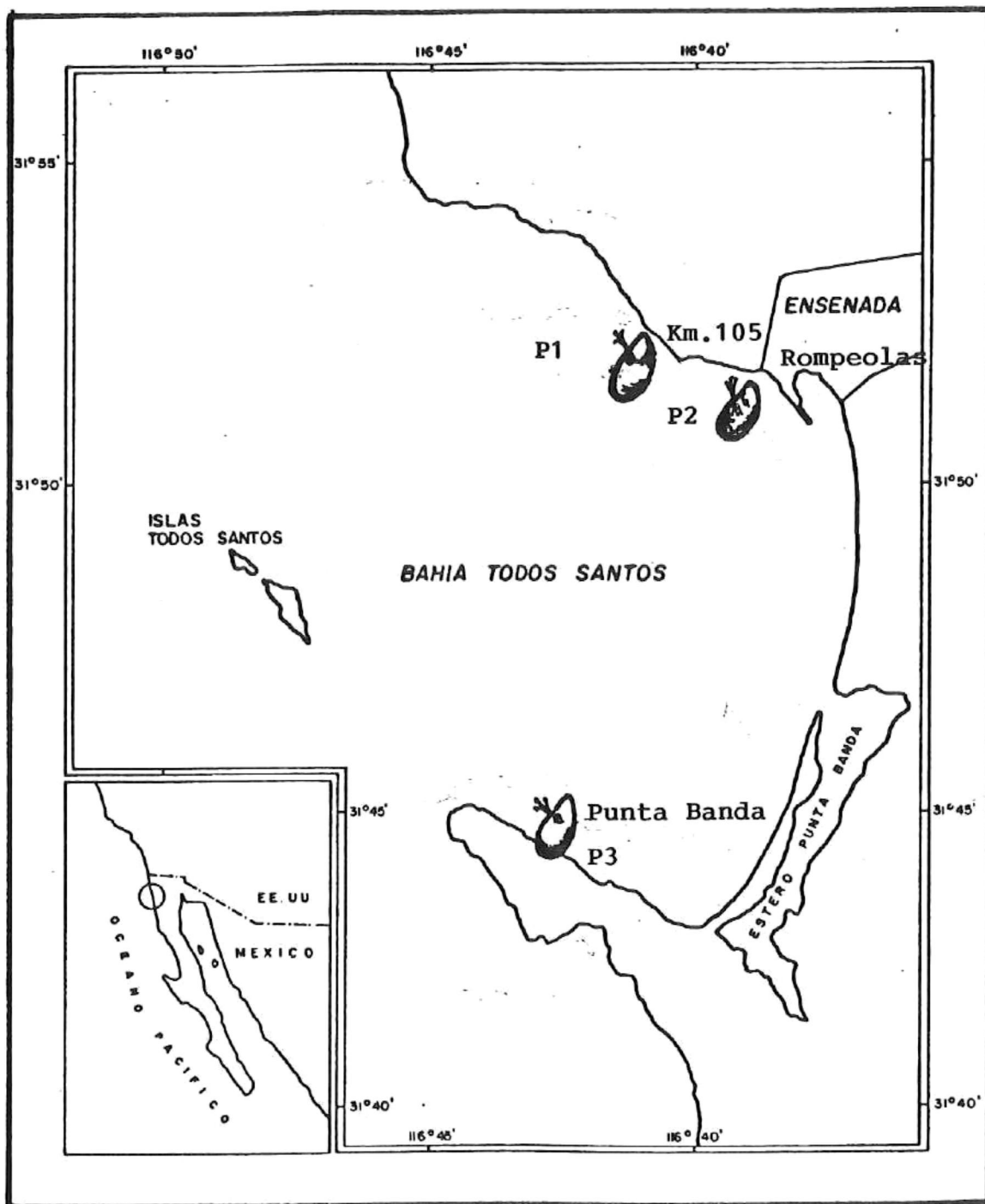


Fig. 4 Zonas de muestreo de *Mytilus californianus* en el intermareal rocoso de Bahía Todos Santos.

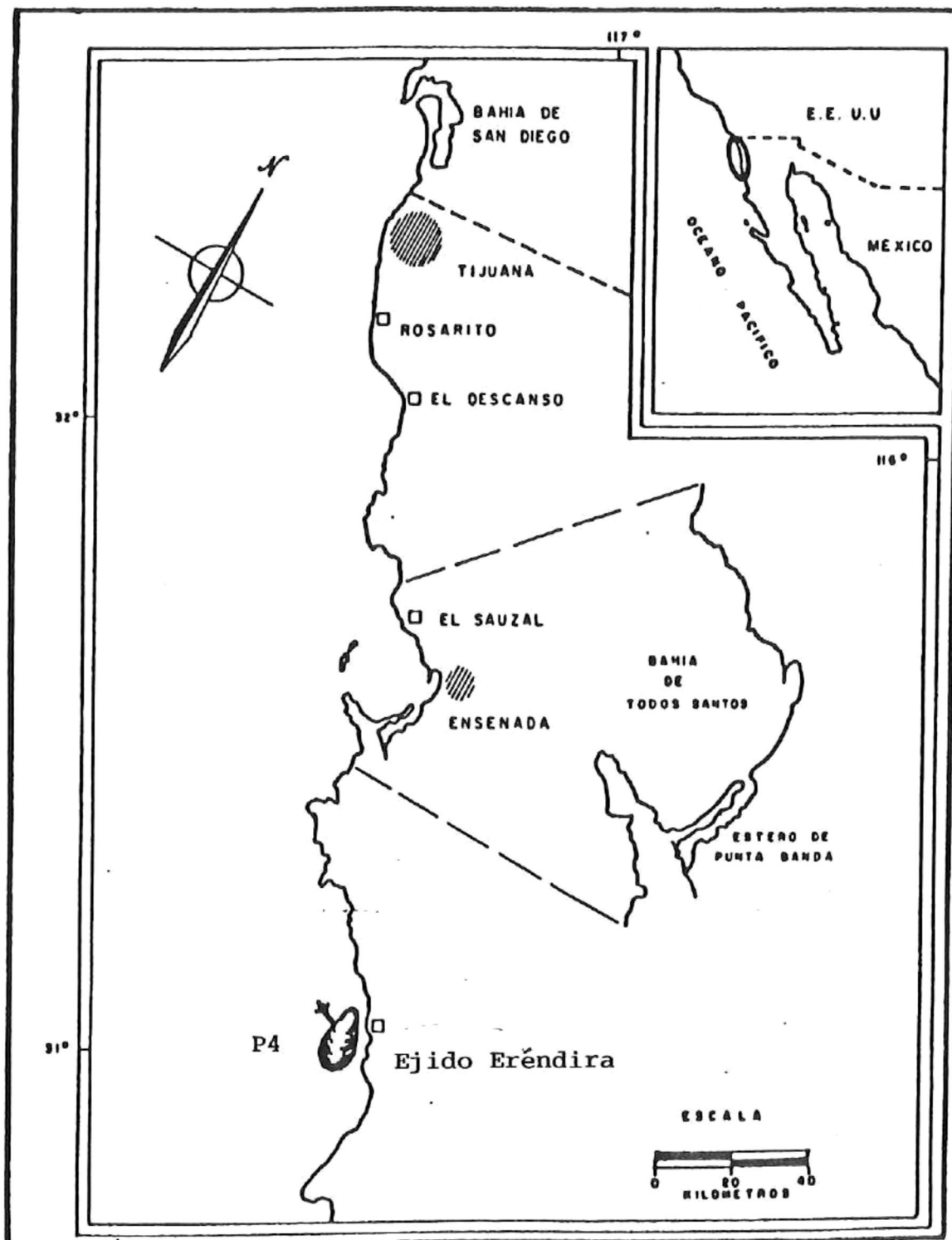


Fig. 5 Zona de muestreo de *Mytilus californianus* en el Ejido Eréndira

TABLA III
CONSTITUYENTES DEL MEDIO BENEX

MEDIO DE CULTIVO PARA ORGANOS DE <i>Mytilus edulis</i> BENEX (1967)	
SUBSTANCIAS	CONCENTRACION (GR/LY.)
NaCl.....	10
KCl.....	1
MgCl ₂	0.15
CaCl ₂	0.20
NaHCO ₃	0.70
Na ₂ HPO ₄	0.30
KH ₂ PO ₄	0.12
Glucosa.....	2
Vitamina C.....	0.10
BUFFERS DE FOSFATO Y BICARBONATO	
ANTIBIOTICOS	(IU/ml)
Penicilina	100
Colmicina	500

(Cit. Recheigl, 1977)

de la abertura del pie y girandola hasta la región visceral (fig.6).

Los organismos fueron regresados a los acuarios y permanecieron en ellos de 6 a 8 h posteriores a la inyección (rango fijado de acuerdo al tiempo invertido en la disección de organismos).

Al cabo del tiempo indicado se extrajo el tubo digestivo el cual se limpió perfectamente por dentro y por fuera (fig.7).

Finalmente se llenó con colchicina al 0.04% w/v en medio Benex, permaneciendo así durante una hora (tabla IV).

El tubo digestivo fué abierto con la ayuda de una aguja y se colocó en agua de mar al 25% v/v (solución hipotónica) durante una hora. El choque hipotónico solamente se aplicó a una parte de los organismos (tabla IV).

La parte interna del tubo digestivo fué raspada con la ayuda de una espátula pequeña hasta obtener una suspensión blanquecina. Finalmente fué cortado en trozos.

Esta suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El botón celular se fijó en metanol - ac. acético (3:1) y se dejó reposar durante 30 min. Esta operación se repitió hasta obtener un sobrenadante translúcido.

Hasta este paso, el material celular se conservó en refrigeración durante 24 h o bien se utilizó para la

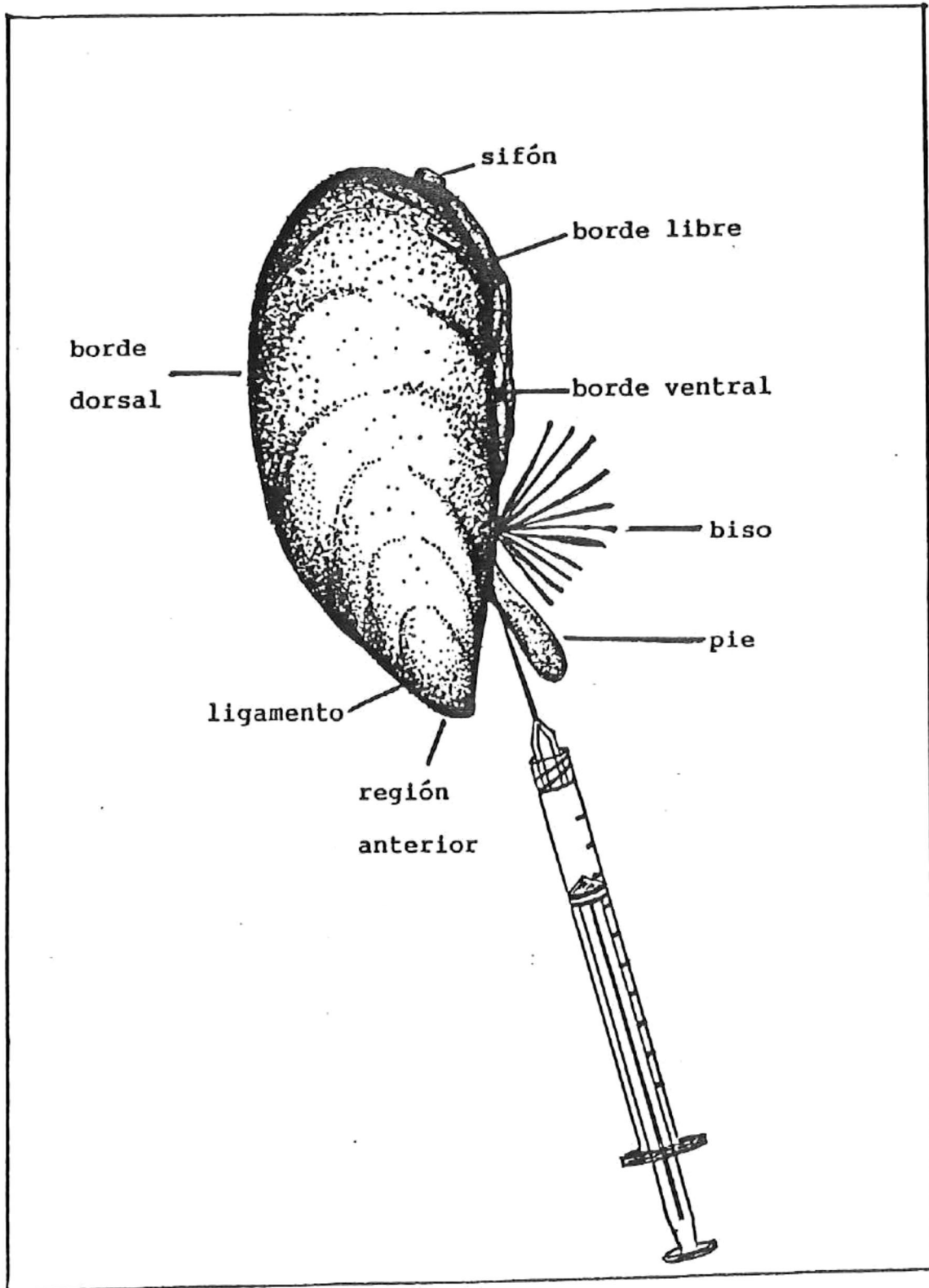


Fig. 6 Representación esquemática de la forma en que los mejillones fueron inyectados para los propósitos del estudio. La inyección se efectuó mediante la abertura del pie girándola hacia la región visceral.

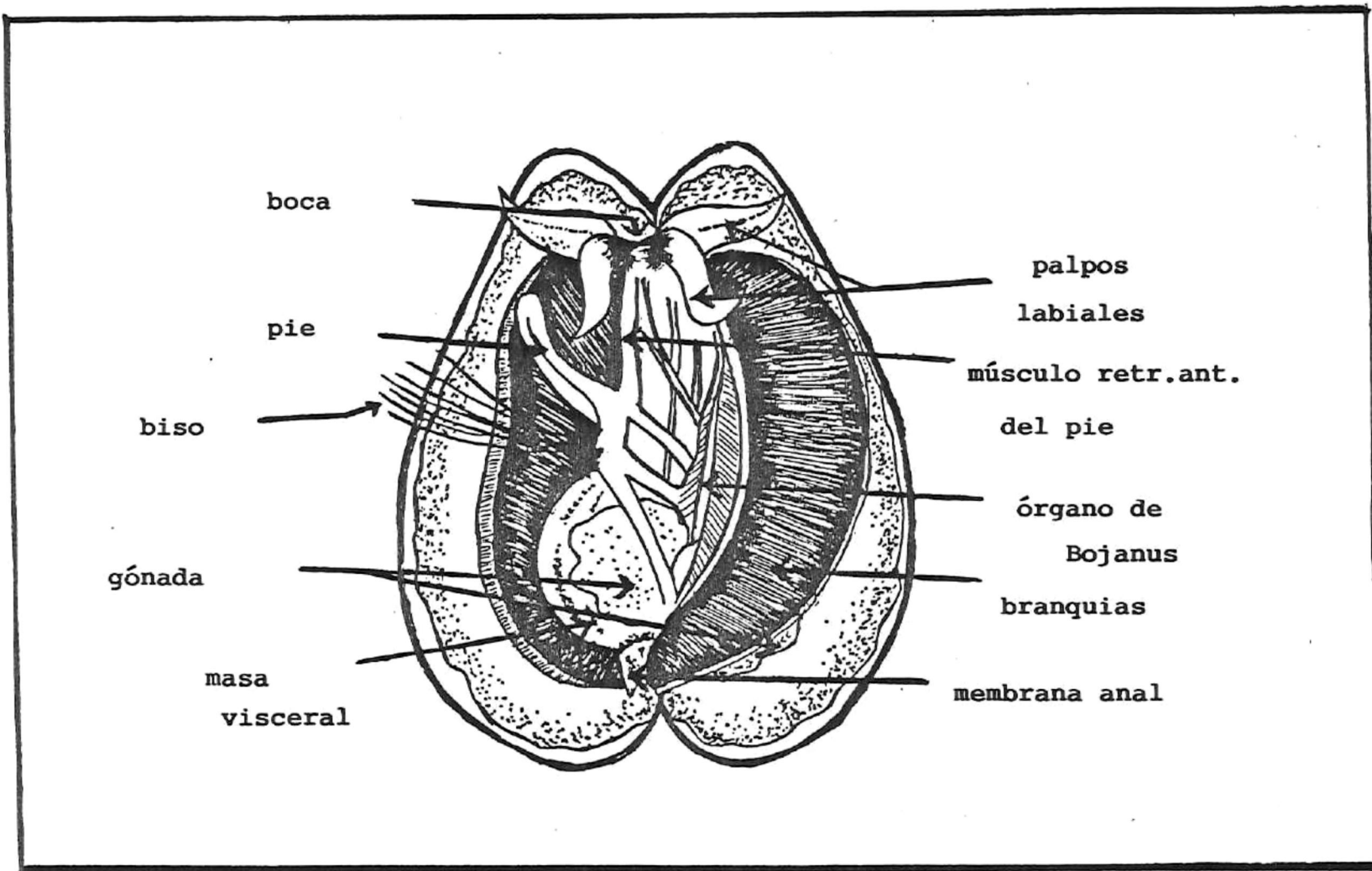


Fig. 7 Esquema de un mejillón abierto (vista ventral). El tubo digestivo se disecó siguiendo su trayectoria desde la boca situada en medio de los palpos, hasta la región terminal.

TABLA IV
METODOLOGIA EMPLEADA DURANTE EL ESTUDIO

POBLACION	1er MUESTREO	2o. MUESTREO	
	* ** ***	* ** ***	SIN COLCHICINA SIN CHOQUE HIPOTONICO SIN COLCH. ADICIONAL
Km.105			
Rompeolas	100 %	50 %	50%
Punta Banda			
Ej.Erendira	de organismos	de organismos	de organismos

* COLCHICINA 0.04% N/V INYECTADA.

** TRATAMIENTO HIPOTONICO (AGUA DE MAR AL 25%).

*** COLCHICINA APLICADA AL TUBO DISECADO.

preparación inmediata de laminillas.

Con una pipeta Pasteur se tomó una muestra de células y se depositó por goteo desde una altura de 1.80 m sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, el cual fué etiquetado previamente. Enseguida, se secó la preparación al calor de un foco y posteriormente se tiñó con Giemsa diluído en soln. amortiguadora de fosfato en una proporción de 1:20 durante 10-15 min a un pH 7.0.

Se hicieron tres preparaciones por organismo; lo cual sumó un total de 240 para todo el trabajo.

Las observaciones se realizaron mediante microscopía de campo claro y contraste de fases, para lo cual se empleó un microscopio *American Optical* provisto de cámara fotográfica.

Los aumentos utilizados fueron de 400X y 1000X.

Las laminillas fueron analizadas mediante un estudio ciego evaluando un mínimo de 1000 células por organismo.

Con cada una de las laminillas se empleó las mismas técnicas de microscopía.

Para cada grupo de organismos se determinó:

- a) Frecuencia en porcentaje de micronúcleos (MN).
- b) Frecuencia en porcentaje de núcleos heteropicnoticos y reticulados (cariorrécticos).
- c) Frecuencia en porcentaje de rupturas nucleares.
- d) Índice mitótico (IM).
- e) Relación de células normales y anormales.

Durante la observación microscópica; siempre se consideraron los siguientes criterios:

I - Contar un promedio de 10,000 células por cada muestra de mejillones.

II - No considerar lo siguiente:

- a) Células traslapadas o amontonadas.
- b) Células con artificios (basura), residuos de otras células o de colorante.
- c) Células con exceso de colorante.
- d) Células con tinción poco clara.

III - Únicamente evaluar lo siguiente:

- a) Micronúcleos redondos u ovalados. En donde la estructura e intensidad de coloración de la cromatina sea similar a la del núcleo principal.
- b) Micronúcleos embebidos dentro del mismo citoplasma que el núcleo principal (Tates et al., 1980). Para corroborar esto se empleó microscopía de contraste de fases.
- c) Micronúcleos próximos pero no unidos al núcleo principal.

INDICE MITOTICO

Calculado de la siguiente manera:

$$\text{I.M.} = \frac{\Sigma \text{ de células en mitosis}}{\Sigma \text{ de células analizadas}}$$

Se anotaron las coordenadas de los campos de interés y se tomaron fotografías, empleando los dos tipos de microscopía antes mencionadas.

ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se efectuó empleando la prueba no-paramétrica de Kruskal - Wallis, de esta manera se determinó la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones de mejillones para cada tipo de aberración.

RESULTADOS

Se obtuvo la experiencia en utilizar un organismo marino (*Mytilus californianus*) para detectar daño genético en células del tubo digestivo. Dicho órgano está considerado dentro de los de mayor exposición (además del epitelio branquial) a diversos contaminantes ambientales como lo son los pesticidas y metales pesados.

El análisis del epitelio proveniente del tracto digestivo, resulta de interés por ser el lugar de digestión de microalgas y bacterias captadas durante la alimentación, las que a su vez pueden portar ciertos contaminantes.

Así mismo se demostró su utilidad en los análisis tendientes a evaluar genotoxicidad, principalmente en lo que a núcleo interfásico concierne; debido a la gran cantidad de material evaluable.

Sin embargo, el índice mitótico (I.M) encontrado, fué muy bajo (ver tabla V). Por lo que el análisis de aberraciones cromosómicas no fué posible llevarse a cabo; lo cual será factible cuando se logre incrementar el I.M. en dicho órgano (fig.8).

El análisis de núcleos interfásicos resulta confiable y altamente discriminativo, puesto que los daños encontrados son fácilmente distinguibles unos de otros.

En el presente estudio se logró identificar cuatro

TABLA V
INDICE MITOTICO

ZONA	I.M. (1ER MUESTREO DIC. 89)	I.M. (2o. MUESTREO A)
P ₁ Km.105	1.64 cels/1000	0.363 cels/1000
P ₂ Rompeolas	nulo	0.78 cels/1000
P ₃ Ej.Erendira	0.94 cels/1000	1.40 cels/1000
P ₄ Pta.Banda	0.66 cels/1000	nulo

Indice mitotico encontrados en los organismos del primer muestreo y grupo A del segundo.

Estos organismos fueron tratados con colchicina 0.04% w/v y choque hipotonico.

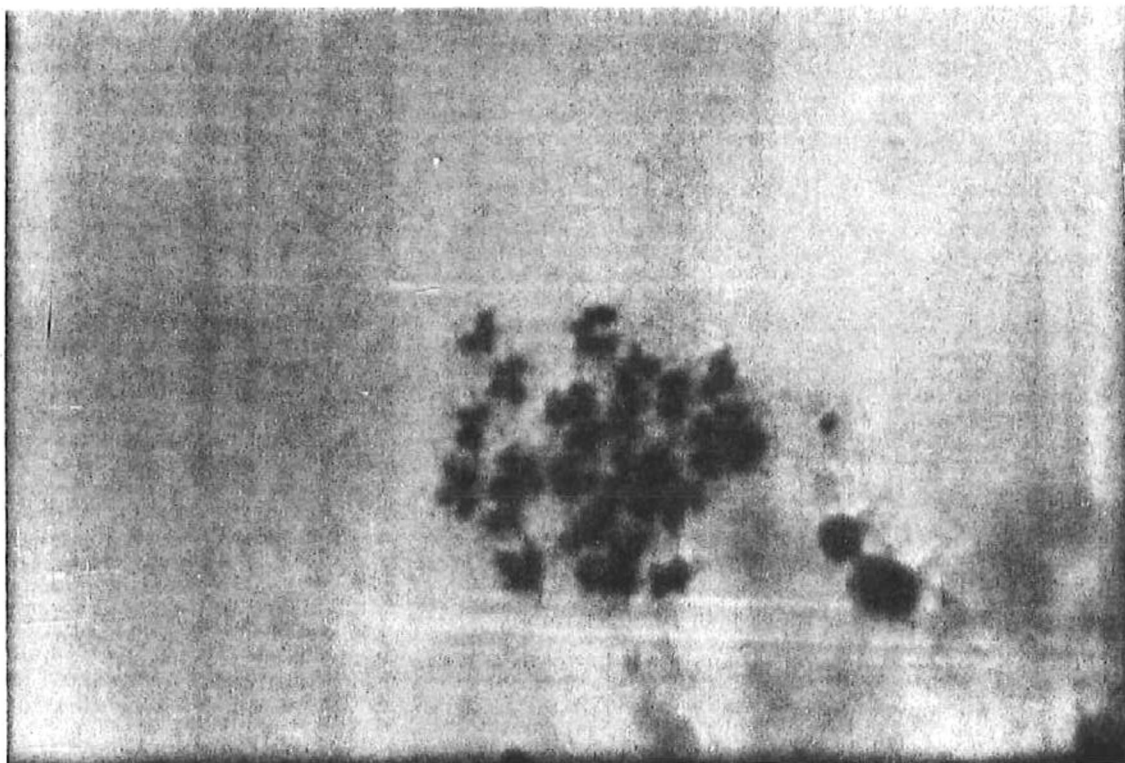


Fig. 8 Metafases como esta fueron detectadas en el estudio. En ellas se observan cromosomas altamente condensados y con poca dispersión. El bajo índice mitótico no permitió el análisis de aberraciones cromosómicas en células epiteliales del tubo digestivo del mejillón californiano.

tipos de aberraciones nucleares: 1) Micronúcleos (MN) 2) Núcleos heteropicnóticos (heteropicnosis nuclear) 3) Núcleos reticulados (núcleos cariorréticos) y 4) Núcleos rotos (rupturas nucleares) (fig.9-12).

ORGANISMOS DEL PRIMER MUESTREO

En los organismos del primer muestreo, los cuales fueron tratados con colchicina al 0.04% w/v y a cuyos botones celulares se les aplicó choque hipotónico (agua de mar al 25% v/v).

Se encontró lo siguiente:

ABERRACION NUCLEAR A NIVEL GLOBAL

A nivel global, el porcentaje de aberración nuclear mas alto correspondió a la zona del rompeolas (22.81%), seguido por la población de Punta Banda (18.91%), Ej.Eréndira (8.09%) y Km 105 (5.92%) (fig.13).

MICRONUCLEOS

La incidencia de micronúcleos (MN) fué:

El Km 105 (0.32%), Punta Banda (0.18%), el rompeolas (0.17%) y la población del Ej.Eréndira (0.055%) (fig.14).

HETEROPICNOISIS Y RETICULACIONES

En lo que respecta a la frecuencia de núcleos heteropicnóticos y reticulados (cariorréticos) se obtuvieron los siguientes resultados:

La población del rompeolas (18.38%), Punta Banda

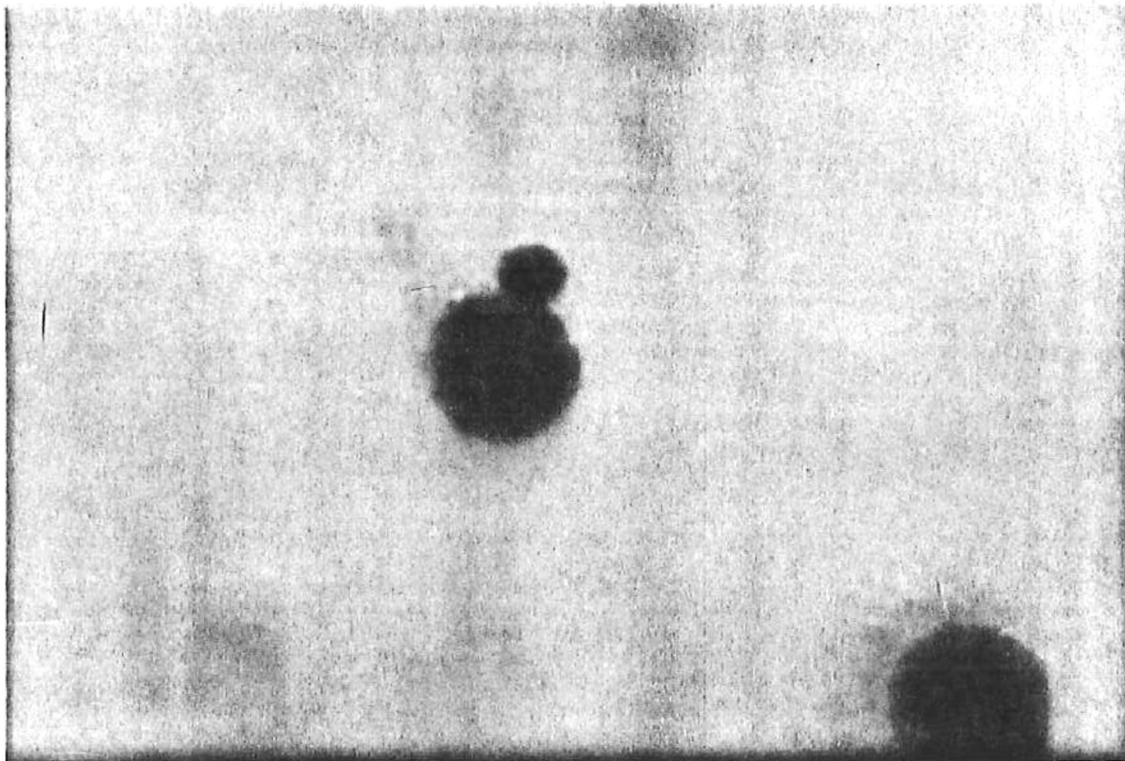


Fig. 9 (a) Micronúcleo próximo al núcleo principal. Los micronúcleos son evidencia de rompimientos cromosómicos o disfunciones del aparato mitótico. Una vez culminada la telofase se manifiestan en una u otra célula como un núcleo secundario. Se han denominado también cuerpos de **Howell-Holly**.

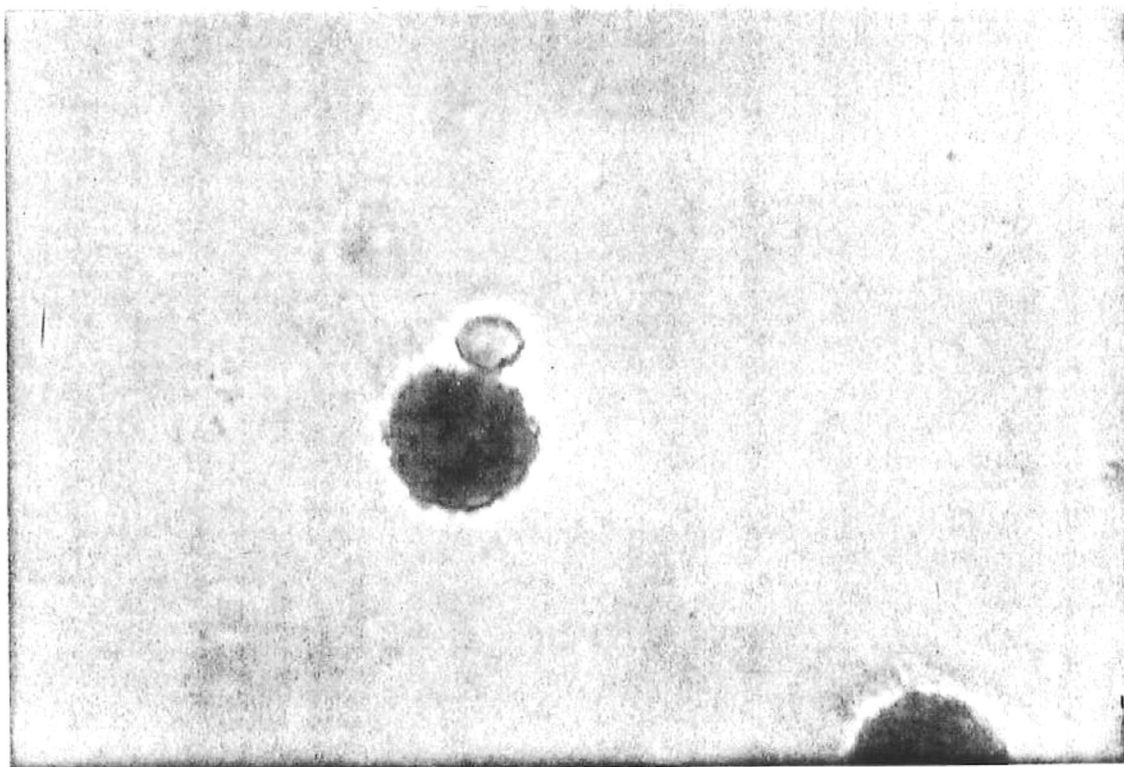


Fig. 9 (b) La microscopía de contraste de fases permite la observación clara de los límites entre el núcleo principal y el micrnúcleo.

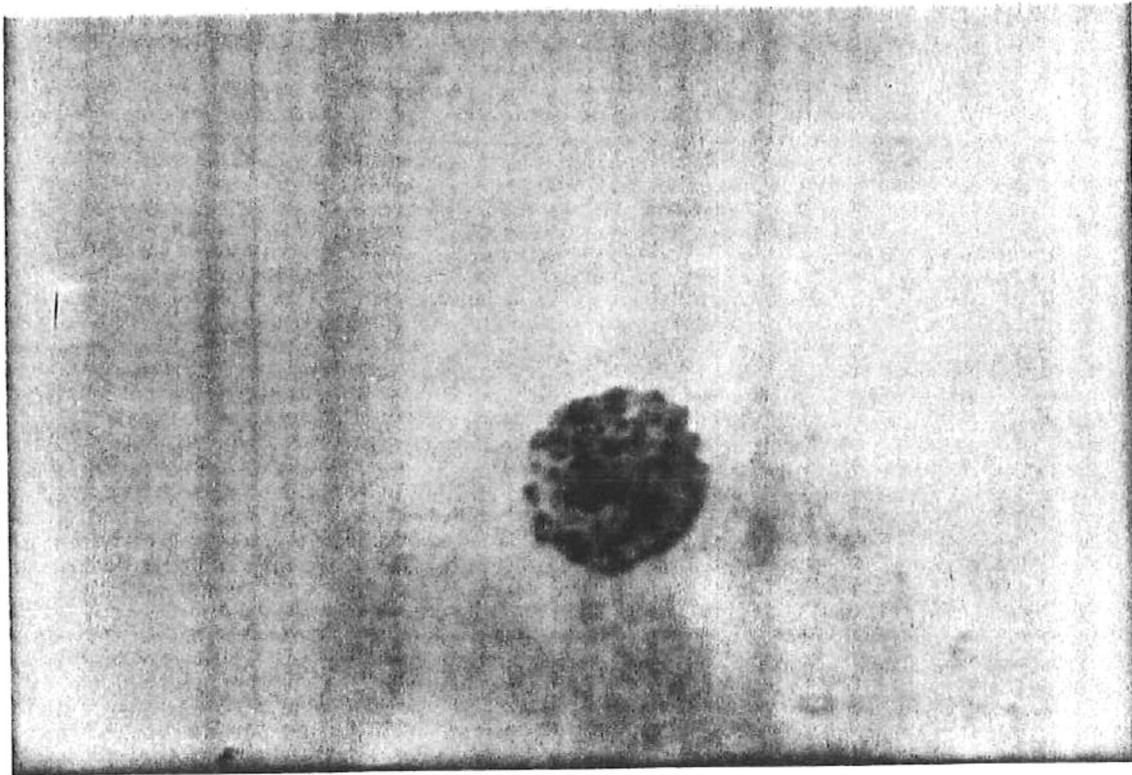


Fig. 10 La heteroploicn3sis nuclear es un fen3meno poco estudiado que se ha relacionado con procesos de inactivaci3n de ciertas regiones del genoma.

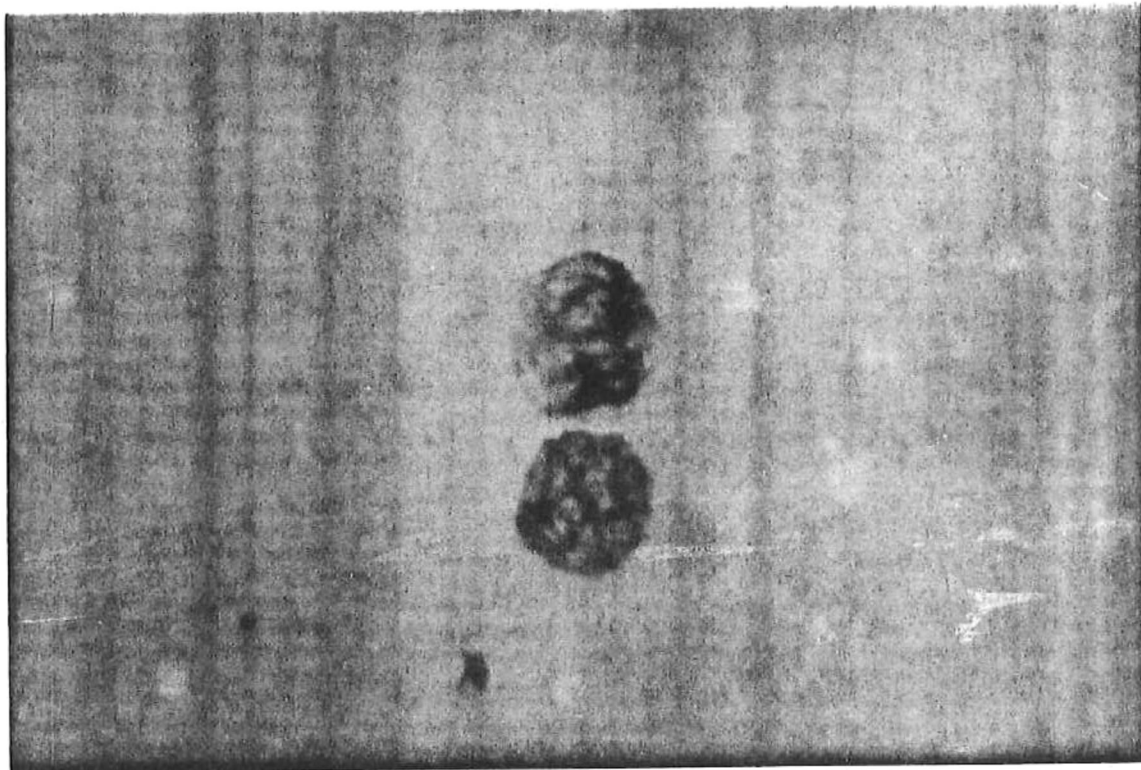


Fig. 11 La cariorrexis nuclear es resultado de una condensación excesiva, por lo que los núcleos parecen estar divididos en fragmentos hipercromáticos.



Fig. 12 Se muestran varios núcleos con pérdida de cromatina como consecuencia de rupturas.

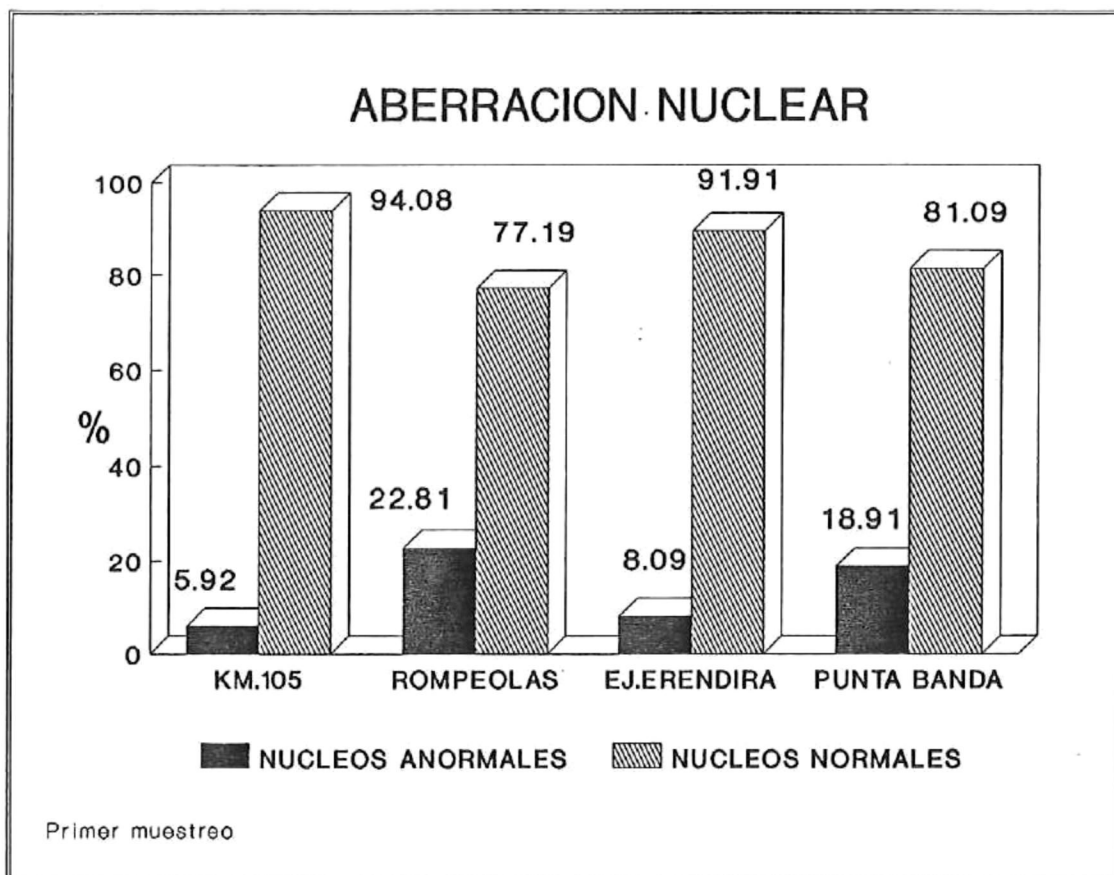


Fig. 13 Frecuencia de núcleos normales y anormales encontrados durante el primer muestreo (dic. 1992) en las cuatro zonas.

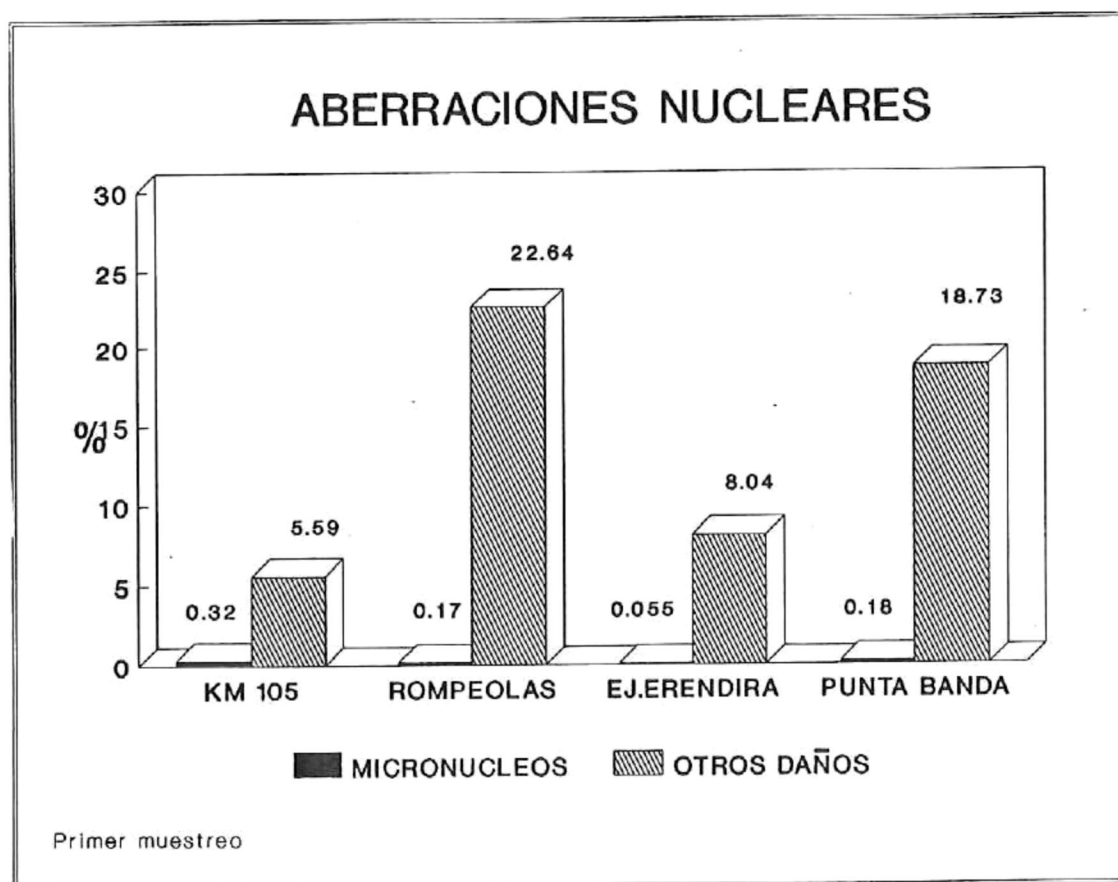


Fig. 14 Frecuencia de micronúcleos (MN) en relación a los otros tipos de aberraciones detectadas.

(16.17%), Ej. Eréndira (4.74%) y el Km 105 (3.64%) (fig.15).

INDICE MITOTICO

El índice mitótico (I.M.) reveló una variación interindividual en la producción de mitosis. 1.64 cels./1000 para la población del Km 105; 0.94 cels./1000 para el Ejido Eréndira; 0.66 cels./1000 para la población de Punta Banda (tabla V).

No se encontraron figuras mitóticas en la población del rompeolas.

RUPTURAS NUCLEARES

El porcentaje de rupturas nucleares fué:

Para la población del rompeolas (5.50%), Ej. Eréndira (3.42%), Punta Banda (2.56%) y por último la del Km 105 reveló un porcentaje de (1.93%) (fig.15).

Estadísticamente existieron diferencias significativas en lo que respecta a micronúcleos, heteropicnosis y reticulaciones (cariorrexis nuclear) entre las poblaciones celulares de las cuatro zonas estudiadas (tabla VI).

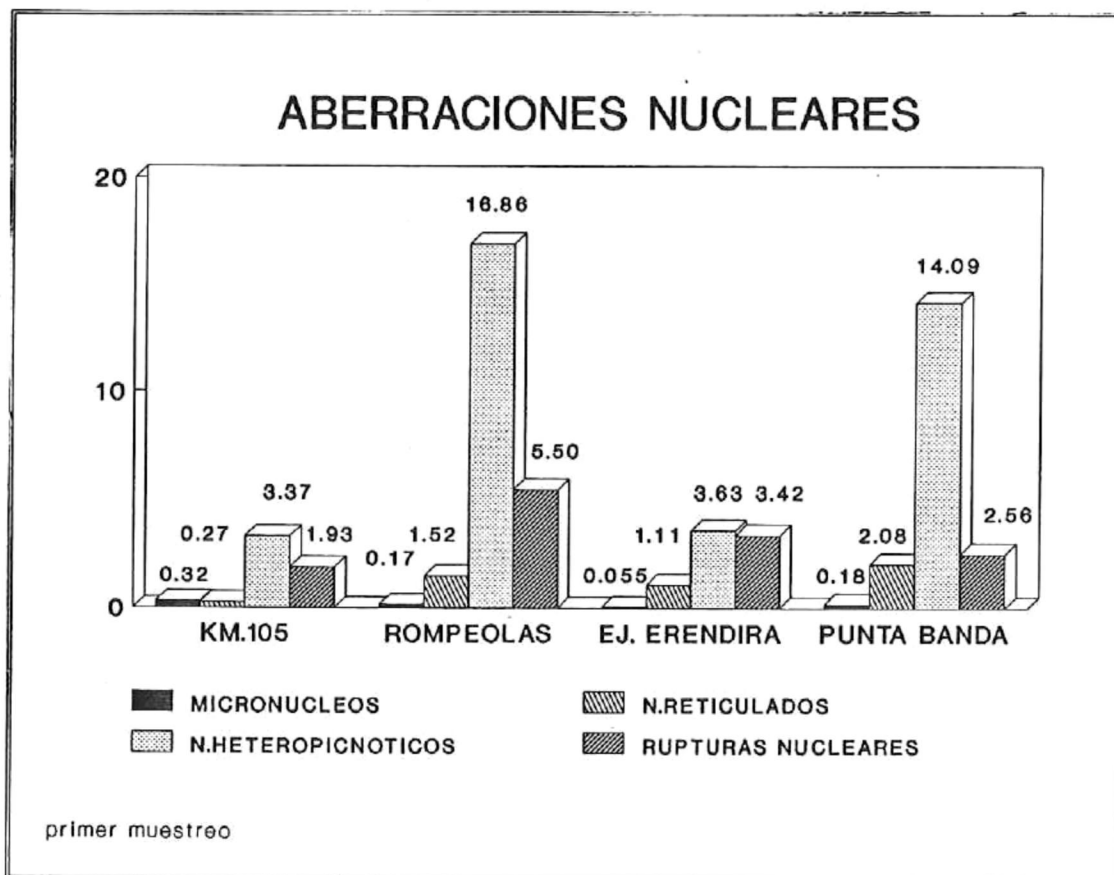


Fig. 15 Frecuencias de los cuatro tipos de aberraciones encontradas durante el primer muestreo (dic. 1989) en las cuatro zonas.

TABLA VI
PRIMER MUESTREO

Aberracion	Nivel de significancia	Estadistico	Observaciones
μ -nucleos	1.29 E-3	15.7268	Diferencias
N.retic.	8.742772 E-5	21.3884	Diferencias
N.heteropic.	2.8541 E-5	23.7227	Diferencias
Ruptura	0.130434	5.6419	No diferencias
Global	0.391721	36.66	No diferencias

De acuerdo a la prueba de Kruskal - Wallis

SEGUNDO MUESTREO

Los organismos correspondientes al segundo muestreo fueron divididos en dos secciones con las que se procedió en forma distinta (tabla IV).

a) Los que fueron tratados con colchicina (0.04% w/v) y además se les aplicó choque hipotónico.

b) Los que no fueron tratados con dicho alcaloide y que no se les aplicó choque hipotónico a sus botones celulares..

ORGANISMOS TRATADOS CON COLCHICINA 0.04%

Los resultados encontrados para los mejillones de inciso (a). Son los siguientes:

ABERRACION NUCLEAR A NIVEL GLOBAL

La mayor incidencia aberración nuclear a nivel global la presentó la población del rompeolas (26.75%); Ej.Eréndira (20.63%); Km.105 (16.44%) y Punta Banda (16.1%) (fig.16).

MICRONUCLEOS

La incidencia en porcentaje de micronúcleos fué:

Para la población del Km 105 (0.072%), Ej.Eréndira (0.052%), Punta Banda (0.038%). Ningún micronúcleo se encontró en la población del rompeolas (fig.17).

HETEROPICNOSIS Y RETICULACIONES

Sin embargo el porcentaje de núcleos reticulados y

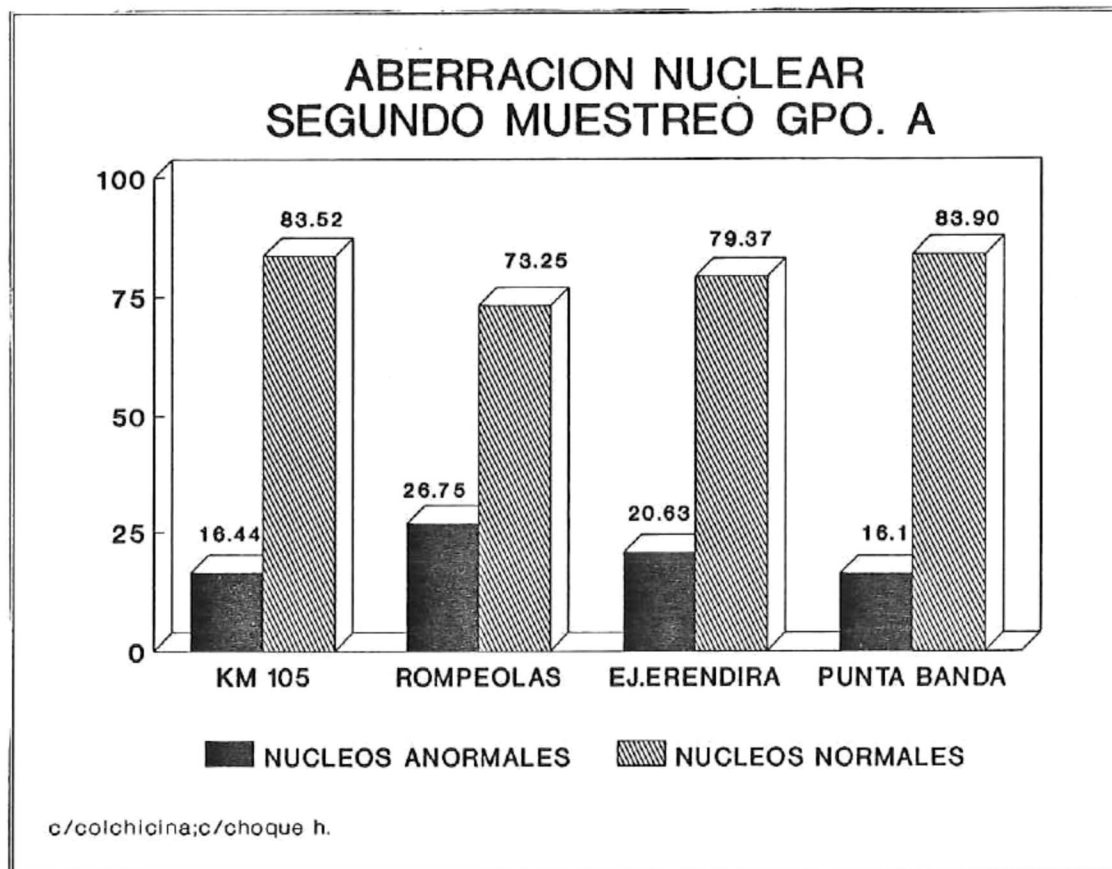


Fig. 16 Frecuencia de núcleos normales y anormales en los organismos del segundo muestreo (abril 1990) grupo A (cels. tratadas con clchicina 0.04% y choque hipotónico).

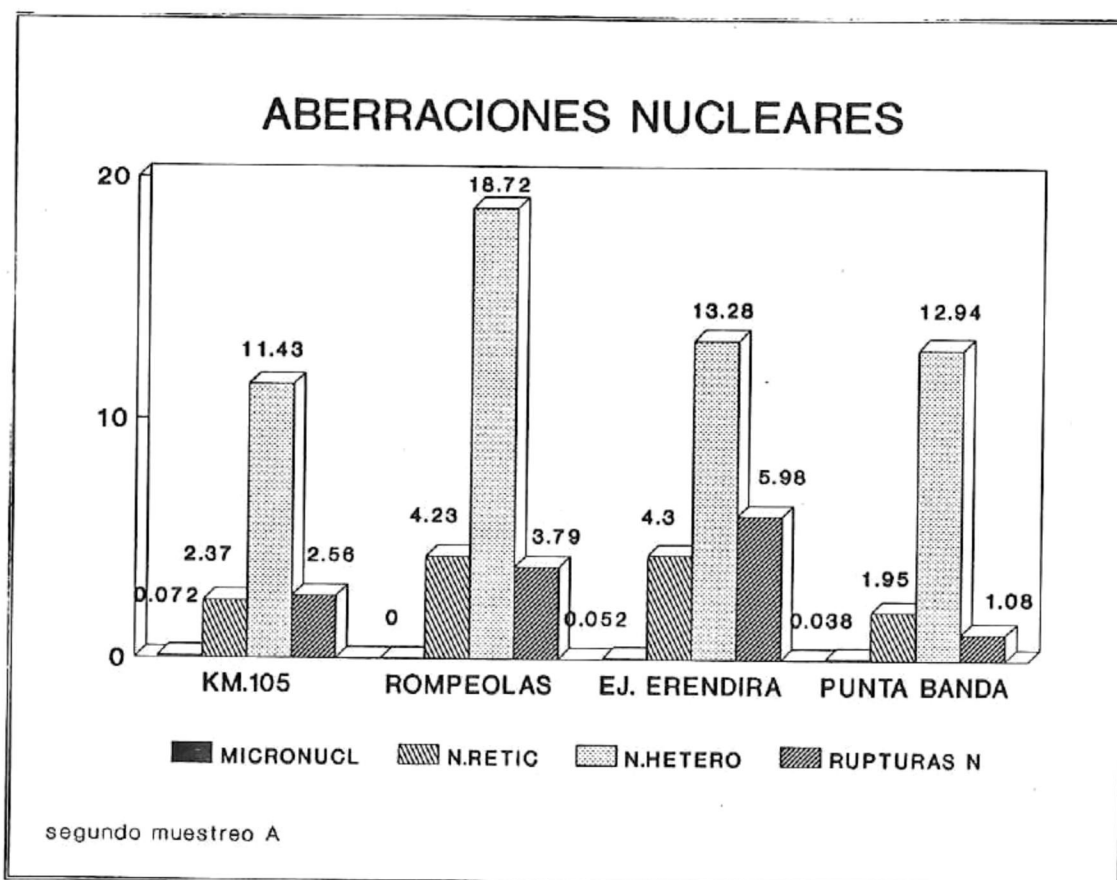


Fig. 17 Frecuencia de aberraciones nucleares encontradas en los organismos del grupo A.

heteropicnóticos encontrados en la población del rompeolas fué la de mayor frecuencia (22.95%), Ej.Eréndira (17.58%) Punta Banda (14.90%) y Km 105 (13.80%) (fig.17).

INDICE MITOTICO

La variación del índice mitótico entre organismos fué notable: Rompeolas (0.78 cels/1000), Ej.Eréndira (1.40 cels/1000) y Km 105 (0.363 cels/1000). No se encontraron mitosis en los organismos de la población de Punta Banda (tabla V).

RUPTURAS NUCLEARES

El porcentaje de rupturas nucleares fué el siguiente: Ej. Eréndira (5.98%), rompeolas (3.79%), Km 105 (2.56%) y Punta Banda (1.08%) (fig.17).

Estadísticamente existieron diferencias significativas en lo que respecta a núcleos reticulados (cariorrexis) y rupturas nucleares (tabla VII).

TABLA VII
SEGUNDO MUESTREO GRUPO A

Aberracion	Nivel de significancia	Estadistico	Observaciones
μ -nucleos	0.302662	3.64317	No diferencias
N. retic.	0.0429515	8.15309	Diferencias
N.heteropic.	0.116708	5.89744	No diferencias
Ruptura	0.0148722	10.48	Diferencias
Global	0.456836	19.0	No diferencias

De acuerdo a la prueba de Kruskal - Wallis

En la otra sección de organismos [inciso (b)] los cuales no fueron tratados con colchicina y a cuyas células no se les aplicó choque hipotónico. Se obtuvo lo siguiente:

ABERRACION NUCLEAR A NIVEL GLOBAL

La mayor incidencia de células anormales a nivel global la presentó la población de Punta Banda (42.61%), rompeolas con (31.30%), Km 105 (23.52%) y Ej.Eréndira (17.16%) (fig.18).

MICRONUCLEOS

La frecuencia en porcentaje de micronúcleos fué: Ej.Eréndira (0.49%); Km 105 (0.32%); rompeolas (0.30%) y Punta Banda (0.18%) (fig.19).

RETICULACIONES Y HETEROPICNOSIS

La población de Punta Banda presentó la mayor incidencia de núcleos reticulados y heteropicnóticos (40.73%); rompeolas (29.06%); Km 105 (21.85%) y Ej.Eréndira (15.55%) (fig.19).

RUPTURAS NUCLEARES

El porcentaje de rupturas nucleares fué el siguiente: Rompeolas (1.93%); Punta Banda (1.68%); Km 105 (1.33%) y Ej.Eréndira (1.11%) (fig.19).

Estadísticamente existieron diferencias significativas unicamente en lo que a núcleos reticulados respecta (tabla VIII).

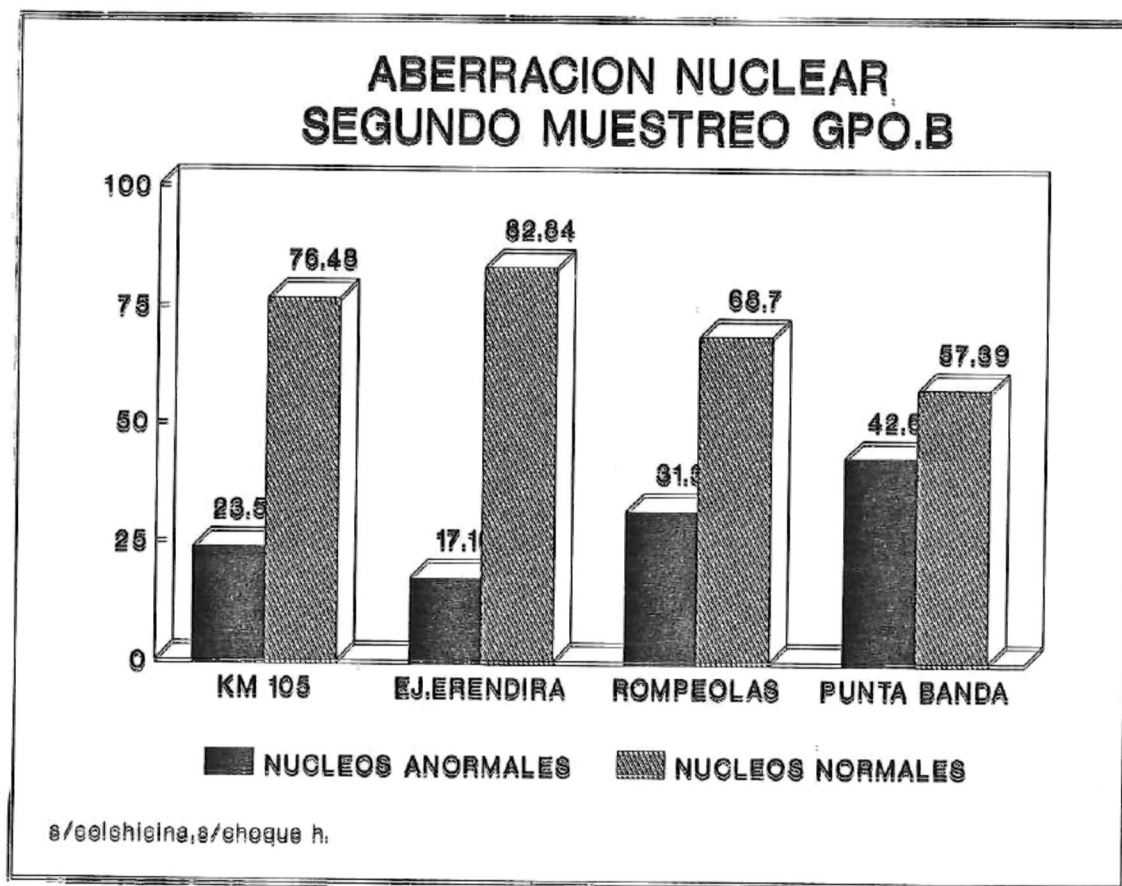


Fig. 18 Frecuencia de núcleos normales y anormales en los organismos del segundo muestreo (abril 1990) grupo B.

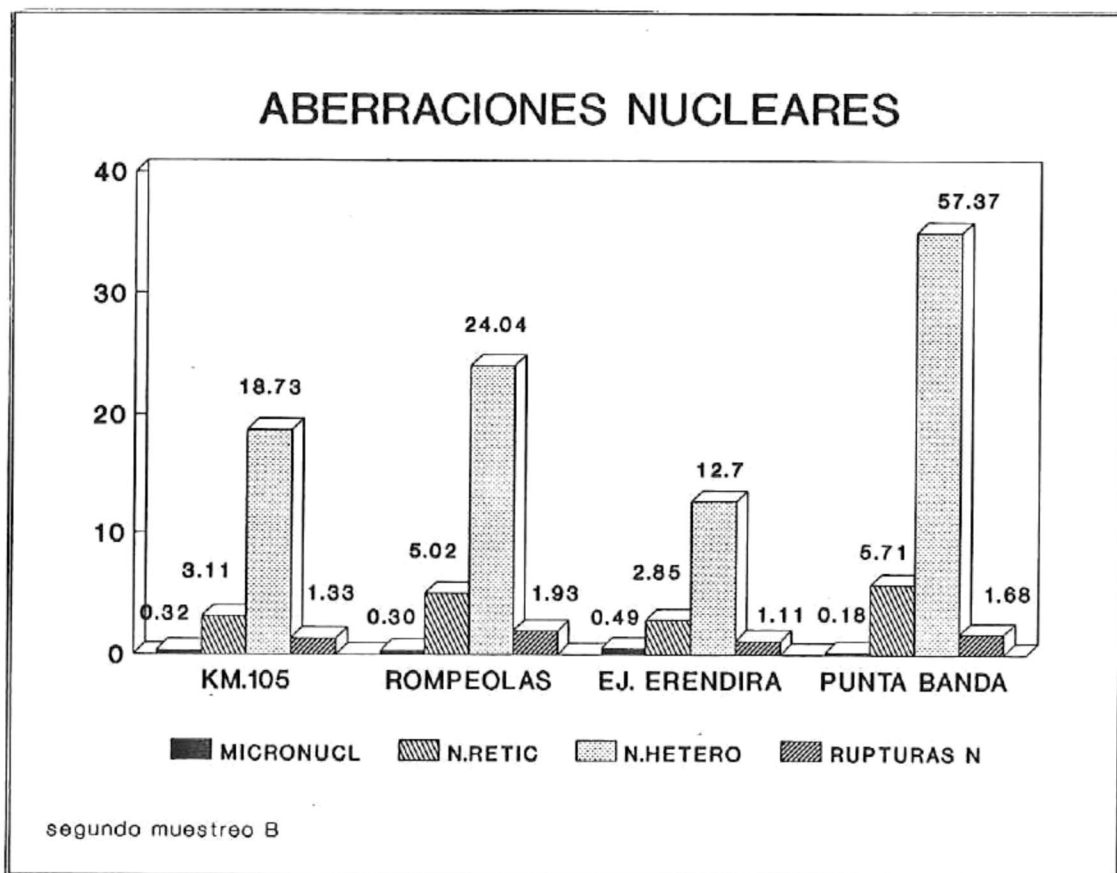


Fig. 19 Frecuencia de los tipos de aberraciones nucleares detectadas en los organismos del grupo B.

TABLA VIII
SEGUNDO MUESTREO GRUPO B

Aberracion	Nivel de significancia	Estadistico	Observaciones
μ -nucleos	0.188961	4.87788	No diferencias
H. retic.	0.0419289	8.20663	Diferencias
H. heteropic.	0.0617366	7.34286	No diferencias
Ruptura	0.769155	1.13283	No diferencias
Global	0.456836	19.0	No diferencias

De acuerdo a la prueba de Kruskal - Wallis

INDICE MITOTICO

El índice mitótico fué, nulo ya que a esta sección de organismos no se le aplicó colchicina, por lo que no es posible la observación de metafases.

En términos generales no se realizó el estudio de aberraciones cromosómicas debido al bajo índice mitótico encontrado a lo largo del presente estudio.

DISCUSIONES

En un principio se pretendió evaluar principalmente las aberraciones cromosómicas, por lo que la metodología seguida en el primer muestreo realizado en diciembre de 1989, fué aquella apropiada para dicho fin; la cual consiste en la aplicación de un agente citostático llamado colchicina además de un choque hipotónico provocado por agua de mar diluída al 25% v/v. Esta técnica es la convencional para estudios enfocados al análisis de cromosomas (Dixon y Clarke, 1982 y Al-Sabti y Kurelec, 1985).

Sin embargo el descubrir un índice mitótico muy bajo en el primer muestreo y con serias diferencias interindividuales; condujo a dar mayor importancia al análisis de aberraciones nucleares como lo son los micronúcleos, heteropicnosis, reticulaciones (cariorrexis) y rupturas nucleares; las que también revelan daños producidos por genotóxicos (Maskens, 1979; Heddle et al., 1983; Brunetti et al., 1986; Goldberg y Chidiac, 1986)

Este fué el motivo por el cual en el segundo muestreo (abril 1990) el procedimiento a seguir fué distinto; es decir, se dividió a los organismos colectados en dos grupos y así poder analizar aberraciones nucleares y nuevamente intentar analizar las aberraciones cromosómicas (ver tabla IV).

Aunque al realizar esto se disminuyó a cinco el número de los organismos estudiados por grupos; las células a analizar siempre fueron minimamente 1000 por organismo.

Con este procedimiento se pretendió dar cabida a ambos tipos de análisis, además de revisar experimentalmente si el choque hipotónico afectaba de algún modo el análisis de micronúcleos; dada la controversia existente en la literatura.

CHOQUE HIPOTONICO

El choque hipotónico provoca el rompimiento de la membrana citoplasmática, lo cual facilita la observación de cromosomas. Consultando la literatura se ha encontrado que su uso resulta variable en los estudios sobre micronúcleos.

En los primeros estudios desarrollados por Von Ledebur y Schmid a principios de los 70's, ellos no emplean el choque hipotónico ni hacen mención al respecto, ya que el tipo de células que analizaron (eritroblastos) no lo requería. Sin embargo señalan que los micronúcleos no son fácilmente distinguibles en tipos celulares con poco citoplasma ya que pueden ser confundidos con lóbulos o protuberancias normales en los núcleos.

Aún más, otros autores emplean la prueba de micronúcleos bajo el mismo fundamento analizando distintos tipos celulares y en muchos de los casos estas pruebas son complementarias a los estudios de aberraciones

cromosómicas, tal es el caso del trabajo de Lasne et al., (1984) en donde emplean el choque hipotónico en ambos en ensayos in vitro.

Por otro lado, algunos autores señalan la necesidad de analizar células con citoplasma (Scarpato et al., 1990) y así mismo existen autores que omiten señalamientos al respecto (Brunetti et al., 1988).

De acuerdo con las observaciones realizadas en el presente estudio, el choque hipotónico provoca el rompimiento de la membrana citoplasmática y no del material cromosómico ni del nuclear; lo cual resulta evidente al observar los núcleos interfásicos enteros y con una envoltura nuclear bien delimitada. Al compararseles con los núcleos de aquellas preparaciones que no recibieron choque hipotónico, se observa que no existe diferencia alguna.

Lo único notable aquí es la diferencia en cuanto al número de micronúcleos encontrados al usar ambas metodologías. Siendo siempre mayor el número de micronúcleos encontrados, al no aplicar el choque hipotónico. Lo cual sugiere que al romper la membrana citoplasmática probablemente también se pierden algunos micronúcleos que quizá sean liberados con otras partes de las células (fig.20).

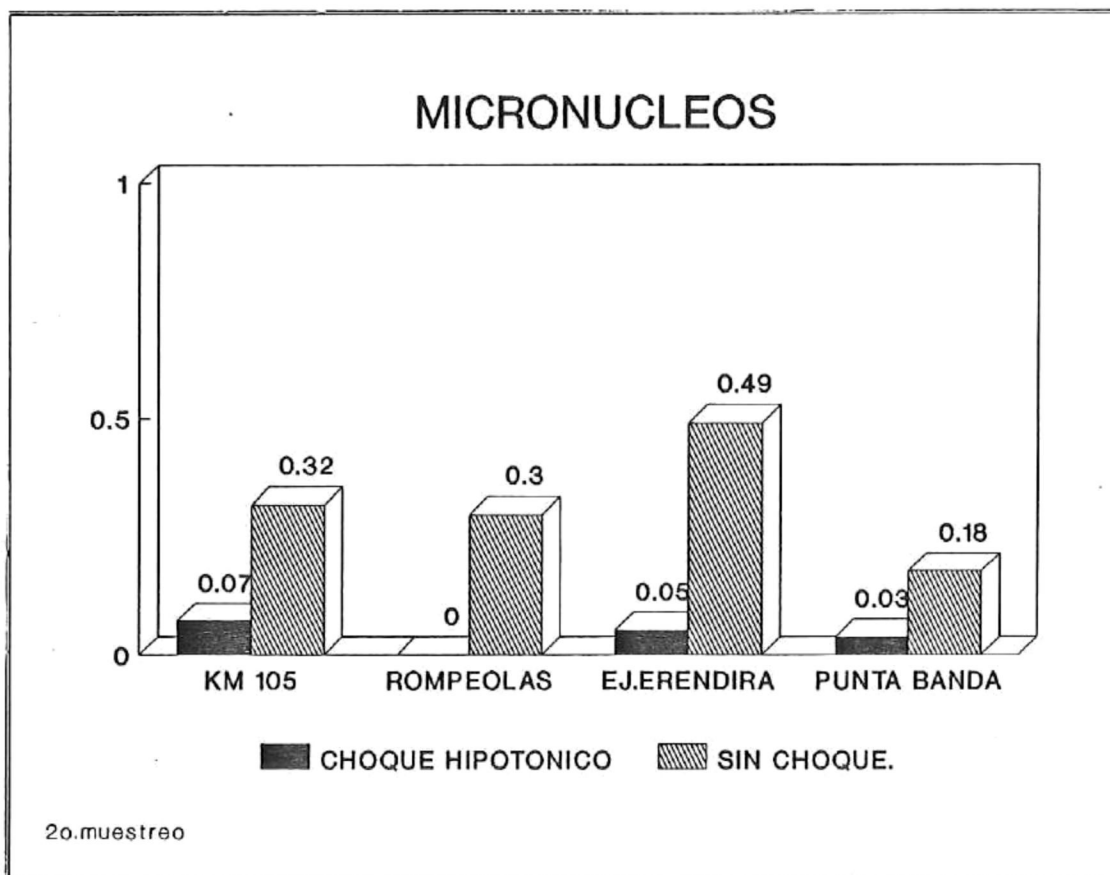


Fig. 20 Frecuencia de micronúcleos detectados al emplear ambos tratamientos.

COLCHICINA

La colchicina es un alcaloide de origen vegetal (*Colchicum sp.*) utilizado en citogenética pues inhibe la polimerización de la tubulina que es el componente del huso acromático; por lo que al actuar en una célula en división esta queda detenida mostrando claramente el material cromosómico.

Algunos estudios han revelado que la colchicina y su derivado colcemida son capaces de provocar cierto tipo de aberraciones nucleares como los micronúcleos lo cual depende principalmente de la dosis aplicada y del tiempo de exposición; lo que permite la observación de un mayor número de micronúcleos dado su efecto acumulativo (Matter y Grauwiler, 1974; Maier y Schmid, 1976).

En el presente trabajo se empleó colchicina a una concentración de 0.04% v/v con un tiempo de exposición de 6 a 8 horas (técnica descrita por Márquez - Becerra, 1989) mismo que resulta insuficiente para la formación de micronúcleos provocados por dicho alcaloide, ya que para ello es necesario que se haya completado un ciclo celular (Scarpato *et al.*, 1990). Es pertinente mencionar que el tiempo de un ciclo celular es aproximadamente de 20 a 24 h.

Al emplear este citostático (que es considerado uno de los más usuales aparte de la vincristina) no se interfirió en el análisis de micronúcleos como pudiera pensarse ya que se empleo una concentración baja y un

tiempo corto. Con lo cual se aseguró que los micronúcleos detectados no fueron consecuencia de la aplicación de colchicina, sino que fueron resultado de la intervención de factores o agentes anteriores al muestreo.

INDICE MITOTICO

El índice mitótico resulta de dividir número de células encontradas en metafase entre el total de células analizadas (generalmente se consideran 1000 cels.).

Como se mencionó anteriormente, el I.M. encontrado en ambos muestreos resultó ser muy bajo y en ocasiones no se encontró ni una sola figura mitótica; lo cual escapa a la suposición de que en los epitelios que se encuentran sujetos a un desgaste continuo, la proliferación celular debería ser mayor. No obstante es posible que los ciclos celulares en el mejillón *M californianus* sean largos y por lo tanto la regeneración sea lenta. Esto considerando que en la mayoría de las células de eucariontes el tiempo promedio para que tenga lugar una división celular es de 20 a 24 h. (Simchen, 1978; De Robertis y De Robertis, 1984; Prescott, 1987).

En general los períodos de síntesis (S) y mitosis (M) se pueden considerar constantes; siendo el período (G1) (de actividad metabólica y crecimiento) el que resulta más variable (Simchen, 1978; Prescott, 1987).

Por otra parte, según Altamirano-Lozano et al., (1989)

el índice mitótico puede ser considerado como un parámetro para medir citotoxicidad, pues el abatimiento del mismo puede ser consecuencia de los altos niveles de mutágenos.

En lo que al presente trabajo respecta, no se puede atribuir con certeza el bajo índice mitótico al efecto genotóxico, dada la necesidad de estudios posteriores más específicos y especialmente diseñados para aclarar ese problema.

ABERRACIONES NUCLEARES

La ventaja de analizar este tipo de aberraciones es de que no se requiere de células en división por lo que el material de estudio resulta ilimitado.

El analizar micronúcleos en células de tubo digestivo de *Mytilus californianus* le dá a nuestro trabajo el carácter de estudio preliminar en la evaluación de genotoxicidad en la Bahía de Todos Santos. Es pertinente mencionar que para obtener un panorama completo en cuanto a lo que ocurre a nivel de núcleo interfásico, también se estudiaron aberraciones diferentes a los micronúcleos pero que no son menos importantes; tales como: Las heteropicnosis, reticulaciones o núcleos cariorréticos y rupturas nucleares.

Parte de la información que arrojan estos análisis en el monitoreo de genotóxicos, corresponde al tipo de agente mutagénico que resulta capaz de inducir una

u otra aberración nuclear.

En el caso de los micronúcleos; estos pueden ser generados por 2 tipos de agentes: a) clastogénicos y b) citotóxicos que afectan al aparato mitótico. Lo cual es posible distinguir con base a su diámetro .

Ya que los micronúcleos producto de la acción de citotóxicos son de mayor tamaño que aquellos producidos por clastógenos dado su mecanismo de acción.

Ahora bien, el significado de un resultado positivo en la prueba de micronúcleos, nos indica que una pérdida cromosómica , o bien, que un rompimiento cromosómico ha ocurrido en la célula.

En la mayoría de los casos, una vez producido el daño aún existe proliferación por lo cual los micronúcleos son transmisibles de una célula a otra por lo menos hasta la interfase próxima. No obstante la presencia de ambos tipos de genotóxicos en el medio marino es muy importante.

Las heteroploidias, rupturas, cariorrexis y apoptósis son evidencia de un daño que pudiera ser muy severo, ya que el blanco puede ser todo el material cromatínico, además de que se les ha relacionado con el desarrollo de cáncer (Goldberg y Chidiac, 1986; Stewart, 1977; Wyllie et al., 1980) y en caso de cariorrexis, este fenómeno ha sido descrito como evidencia de muerte celular (Hamm, 1977)

Sin embargo, algunos de estos daños pueden ser reversibles en un momento dado; ya que para contrarrestar

los efectos, los organismos tienen sistemas de reparación que van desde aquellos a nivel molecular (como la selectividad de enzimas que llevan a cabo la síntesis de ADN); hasta los sistemas de desintoxicación por células y tejidos. Esto último se ha mencionado como un " arma de dos filos " dado el tipo de interacción con agentes considerados como no mutagénicos o inócuos.

Además, si consideramos que durante el análisis microscópico deben de escogerse cuidadosamente los campos de observación con el fin de evitar al máximo, factores que pudieran generar error (no considerar células traslapadas, artificios, células mal teñidas etc.) Cabe mencionar que los resultados de frecuencias de micronúcleos son aproximaciones válidas de lo que realmente ocurre en los organismos, a nivel genético.

PRIMER MUESTREO

Organismos tratados con colchicina y con choque hipotónico

Los datos obtenidos durante el primer muestreo coinciden con una de las hipótesis de trabajo en la que se planteó que en una zona de mayor contaminación se tiene mayor probabilidad de que estén presentes en el medio, diversos agentes que provoquen dano al material genético. Lo cual efectivamente ocurrió en los organismos provenientes de la zona del Rompeolas cuyos núcleos

presentaron un mayor porcentaje de aberración nuclear global (22.81%), así como mayores porcentajes en lo que respecta a reticulaciones y heteropicnosis nuclear (18.38%) además de las rupturas (5.50%).

Por otra parte, los organismos que presentaron un menor porcentaje de aberración nuclear global fueron los colectados en : el Km 105 (5.92%) y Ej.Eréndira (8.09%). Cabe hacer notar que ambos sitios difieren grandemente del resto de las zonas.

Un dato interesante, es que los organismos de las zonas que presentaron un porcentaje bajo de aberración nuclear, el índice mitótico fué alto (aunque insuficiente para efectuar el análisis cromosómico) y en las zonas que presentaron un porcentaje alto de aberración nuclear, dicho índice fué nulo. Esto coincide con las observaciones de Altamirano-Lozano et al., (1989) sobre el efecto de agentes mutagénicos y teratogénicos probados en laboratorio, donde concluyen que a fuertes dosis de genotóxicos el índice mitótico se abate.

SEGUNDO MUESTREO

Grupo A: Organismos tratados con colchicina y con choque hipotonico.

Nuevamente la zona del rompeolas fué la que presentó el mayor porcentaje de aberración nuclear a nivel global

0.49% y se distinguió por ser el más elevado. Este dato coincide con lo reportado por Brunetti *et al.*, (1988) para una zona altamente eutrófica en Venecia (0.49%).

Además, se observa claramente las diferencias en frecuencias de micronúcleos de acuerdo a ambas metodologías; por lo que el choque hipotónico pudiera afectar el estudio de los mismos provocando pérdidas junto con la membrana citoplasmática.

Así también, se debe considerar que en el primer muestreo, y en los organismos del grupo A, quizás se subestimaron los resultados de las frecuencias de micronúcleos.

Aunque los porcentajes de frecuencias de micronúcleos no rebasan el 1%, el dato del Ejido Eréndira (0.49%) realmente desconcierta y demuestra que quizás esta zona en ciertas épocas del año no pueda ser considerada como prístina, a pesar de tratarse de un zona abierta. Sin embargo es lugar de grandes bancos de mejillones de tallas que alcanzan los 14 cm de longitud.

Por otra parte, la heteropicnosis que se presentó en frecuencias mucho más altas, sugiere que pudiera existir una mayor predisposición de los organismos a cánceres y tumores en tejidos como el tubo digestivo. Sin embargo, no es posible predecir el futuro de las poblaciones de mejillones de la Bahía Todos Santos.

Lo cierto es que los procesos adaptativos y evolutivos

en los organismos, con relación a las perturbaciones ambientales son lentos y en la medida que los contaminantes con actividad mutagénica continuen siendo introducidos en la biosfera estos seguirán aumentando la tasa mutacional en los organismos, los cuales no siempre presentarán sistemas de reparación efectivos.

Así mismo se debe considerar que estas poblaciones se encuentran sometidas a una fuerte depredación clandestina lo que no permite evaluarlas y discernir hasta que punto están mermando a causa del efecto genotóxico de los contaminantes.

Por último, el daño celular encontrado en los mejillones colectados en diciembre de 1989 y abril de 1990 pudiera ser reflejo de una gran cantidad de factores ambientales que van desde desde fisicoquímicos hasta biológicos y que son particulares de esas épocas del año; los cuales no son estáticos a través del tiempo.

De aquí que en el segundo muestreo los porcentajes de aberración celular no permanezcan constantes e igualmente presentes en las células de los organismos.

CONCLUSIONES

- 1.- El índice mitótico es bajo en las células del epitelio del tubo digestivo de *Mytilus californianus*.
- 2.- Claramente se distinguen cuatro tipos de aberraciones nucleares:
 - a)-Micronúcleos
 - b)-Núcleos heteropícnóticos.
 - c)-Núcleos reticulados.
 - d)-Rupturas.
- 3.- El aplicar choque hipotónico puede generar pérdida de material como los micronúcleos. Sin embargo resulta muy útil en el estudio de cromosomas.
- 4.- La colchicina al 0.04% w/v con un tiempo de exposición de 8 h (máximo) posiblemente no altere el análisis de micronúcleos, ya que para el estudio de los mismos se requiere de que haya tenido lugar un ciclo celular completo.
- 5.- En el primer muestreo se observa cierta relación entre frecuencias altas de aberraciones nucleares y las zonas de muestreo con mayor contaminación.
- 6.- El índice mitótico (índice de división celular) se ve abatido en las zonas que presentan mayor frecuencia de aberraciones nucleares, lo que sugiere que en los tejidos con células dañadas no es posible la regeneración rápida de los mismos .

- 7.- De acuerdo con el análisis estadístico de Kruskal - Wallis existen diferencias significativas en lo que concierne a micronúcleos, núcleos heteropicnóticos y reticulados; entre las cuatro poblaciones de organismos.
- 8.- En el segundo muestreo (grupos A y B) las frecuencias de aberraciones nucleares se ven incrementadas en los organismos de las cuatro zonas estudiadas. Como muestra de ello se tiene a la población del Ejido Eréndira que presentó 0.49% en la frecuencia de micronúcleos.
- 9.- Las aberraciones detectadas son efecto de sustancias genotóxicas presentes en el medio marino. Sin embargo no hay que descartar la posibilidad de la intervención conjunta de factores fisicoquímicos y biológicos que provoquen variación en sus frecuencias de aparición.

RECOMENDACIONES

- * En la medida de lo posible diseñar un experimento tendiente a aclarar el problema del bajo índice mitótico (I.M) en las células epiteliales del tubo digestivo del mejillón *Mytilus californianus*;
- * Evitar emplear el choque hipotónico en los estudios sucesivos sobre micronúcleos.
- * Fomentar estudios interdisciplinarios tendientes a explicar desde un enfoque global los problemas de efectos de genotóxicos en los organismos marinos.
- * En la medida de las posibilidades continuar este tipo de estudios ya que solo ellos revelan el efecto de sustancias genotóxicas presentes en el medio marino.
- * El analizar aberraciones en núcleo interfásico es recomendable como análisis de rutina en el monitoreo de genotóxicos ambientales.

LITERATURA CITADA

- Al-Sabti, K. y Kurelec, B. (1985). Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Watch. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35:660-665.
- Altamirano - Lozano, M. A; Camacho - Manzanilla, M. C.; Loyola - Alvarez, R. y Roldan - Reyes, E. (1989). Mutagenic y teratogenic effects of diazinon. Rev. Int. Contam. Ambient. 5:49-58.
- Ayala, F. J. y Kiger J. A. Jr. (1984). Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano. 534-581.
- Battaglia, B; Bisol, P. M. y Rodino, E. (1980). Experimental studies on some genetic effects of marine pollution Helgolander Meeresunters. 33:587-595.
- Bayne, B. L; Moore, M. N; Widdows, J. Livingstone, D. R. y Salkeld, P. (1979) Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: Studies with bivalve molluscs. Phil. Trans. R. Soc. Lond B. 286:563-581.
- Bayne, B. L; Clarke, K. R. y Moore, M. N. (1981). Some practical considerations in the measurement of pollution effects on bivalve molluscs and some possible ecological consequences. Aquatic Toxicology 1:159-174.
- Brunetti, R; Gola, I y Majone, F. (1986). Sister - Chromatid exchange in developing egg of *Mytilus*

- galloprovincialis* Lmk (Bivalvia). Mutation Res. 174:207-211.
- Brunetti, R; Majone, F; Gola, I y Beltrame, C.(1988). The micronucleus test: Examples of application to marine ecology. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44:65-68.
- Brungs, W. A y Mount, D. I. (1978). Introduction to a discussion of the use of aquatic toxicity test for evaluation of the effects of toxic substances. En: Cairns, J; Dickson, K. L. y A. W. Maki (Eds.) Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life ASTM STP 657 American Society for Testing and Materials. Philadelphia, Pha. 15-26.
- De la Garza - Montaña, C.(1987). El Cultivo del mejillón en Galicia España. Acuavisión. Revista Mexicana de Acuicultura. 10:17-21.
- De Robertis, E. D. P y De Robertis E. M. F. (1984). Biología celular y molecular. Décima edición. Ed. Ateneo. 348.
- Dixon, D. R. (1982). Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. Marine Biology Letters. 3:155-161.
- Dixon, D. R. y Clarke K. R. (1982). Sister - chromatid exchange: A sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. Marine Biology Letters 3:163-172.

- Drake J. W .y Flame, G. (1972). The molecular basis of mutation. En: Sutton, E. H. y M. I. Harris (Eds). Mutagenics effects of environmental contaminants. Academic Press Inc. 15-26
- Goldberg, E. D; Bowen, V. T; Farrington, J. W; Harvey, G; Martin, J. H; Parker, P. L; Risebrough, R. W; Robertson, W; Schneider, E y Gamble, E. (1978). The mussel watch. Environ. Conserv. 5:1-25.
- Goldberg, M. T. y Chidiac, P. (1986). An in vivo assay for small intestine genotoxicity. Mutation Res. 164: 209-215.
- Gutiérrez - Galindo, E. A; Sañudo - Wilhelmy, S. A. y Flores - Baéz, B. P. (1983a). Variación espacial y temporal de pesticidas organoclorados en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad) de Baja California. Ciencias Marinas 9:7-18.
- Gutiérrez - Galindo, E. A; Flores - Baez, B. P. y Sañudo - Wilhelmy, S. A. (1983b). Variación espacial y temporal de bifenilos policlorados (Aroclor 1254) en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad) de Baja California. Ciencias Marinas. 9:19-25.
- Hamm, W. A. (1977). Tratado de histología. 7ma. edicion. Ed. Interamericana. 89
- Harderlie, E. C y Abbott, D. P. (1980). Bivalvia: The clams and allies. En: Morris, R. H; Abbott, D. P. y Harderlie, E. C. (Eds.) Intertidal

- invertebrates of California. Stanford University Press. Stanford California. 360-361.
- Harrison, F. L y Jones, I. M. (1982). An in vivo sister - chromatid exchange assay in the larvae of the mussel *Mytilus edulis*: Response to three mutagens. Mutation Res. 105:235-242.
- Heddle, J. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Res. 18:187-190.
- Heddle, J. A; Hite, M; Kirkhart, B; Mavournin, K; MacGregor, J. T; Newell, G.W. y Salamone. M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene - Tox Program. Mutation Res. 123:61-118.
- Hofnung, M. y Quillardet, P. (1984). Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. Mutation Res. 132:141-42
- Lasne, C; Gu, Z. W; Venegas, W y Chouroulin, I. (1984). The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen - carcinogens: comparison with the in vitro sister - chromatid exchange assay. Mutation Res. 130:273-282.
- Macek, K. J; Petrocelli, S. R. y Sleight, B. H. (1979). Considerations in assesing the potential for and significance of biomagnification of chemical residues in aquatic food chains. En: Markins, L. L. y Kimerle, R. A. (Eds) Aquatic toxicology ASTM STP 667. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, Pha.

251-268.

- Maier, P. y Schmid, W. (1976). Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutation. Res.* 40:325-338.
- Majone, F; Brunetti, R; Gola, I y Levis, A. G. (1987). Persistence of micronuclei in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* after treatment with mitomycin C. *Mutation. Res.* 191:157-161.
- Majone, F; Beltrame, C.y Brunetti, R. (1988). Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. *Mutation Res.* 209:131-134.
- Márquez - Becerra, C. (1987). Un método in vivo para evaluar la genotoxicidad en branquias del mejillón *Mytilus californianus*. VII. Congreso Nacional de Oceanografía. 380.
- Márquez - Becerra, C. (1989). Método para incrementar el número de mitosis en preparaciones de branquias y tubo digestivo del mejillón *Mytilus californianus*. Memorias: 1a. Reunión Nacional de Investigación de la Sociedad Mexicana de Genética. 11-13 Oct.1989. La Trinidad, Santa Cruz Tlax. México.86-88.
- Maskens, A. P.(1979). Significance of Karyorrectic index in 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis. *Cancer Letters.* 8:77-86.
- Matter, B. E.y Grauwiller, J. (1974). Micronuclei in mouse bone - marrow cells. A simple in vivo model for the

- evaluation of drug - induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 121:211-223.
- Nelson, D. A; Miller, J. E y Calabrese, A. (1988). Effect of heavy metals on bay scallops, surf clams and blue mussels in acute and long - term exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17:595-600.
- Prescott, D. M. (1987) Cell Reproduction. *Int. Review. Cytol* 100:93-128.
- Peddicord, R. K. (1984). What is the meaning of bioaccumulation as a measure of marine pollution effects? En: White, H. H. (Ed.) Concepts in marine pollution measurements. Maryland Sea Grant Publ. 249-259.
- Recheigl, Jr.(Ed).(1977). CRC. Handbook series in nutrition and food. vol IV CRC Press. 131-169.
- Reynoso - Nuño, H.E. y Jorajuria, A.(1988). Distribución de metales pesados en la costa occidental de la Península de Baja California, usando *Mytilus californianus* como organismo centinelas. *Ciencias Marinas.* 14:101-116.
- Ronen, A y Heddle, J.A.(1984). Site - specific induction of nuclear anomalies (apoptotic bodies and micronuclei) by carcinogens in mice. *Cancer. Res.* 44:1536-1540.
- Scarpato, R; Migliori, L; Alfinito - Cognrtti, G y Barale, R. (1990). Inducction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine pollution bulletin.* 21:74-80.

- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.* 31: 9-15.
- Simchen, G. (1978). Cell cycle mutants. *Ann. Rev. Genet.* 12:161-191.
- Stewart, L. H. (1977). Discussion paper: Enigmas of cancer in relation to neoplasms of aquatic animals. En: pollutants and biologic effects with emphasis on neoplasia 298:305-315.
- Straughan, P. (1977). Effects of natural chronic exposure to petroleum hydrocarbons on size reproduction in *Mytilus californianus* Conrad. En: Vernberg, F. J.; Calabrese, A.; Thurbeg, F. P. y W. B. Vernberg (eds.) Physiological responses of marine biota pollutants. Academic Press. London. 289-298.
- Suárez - Vidal, C. E. y Acosta - Ruíz, M. J. (1976a). Distribución de las concentraciones de DDT en el mejillón *Mytilus californianus* en la parte noroccidental de la Baja California. *Ciencias Marinas.* 3:1-7.
- Suárez - Vidal, C. E. y Acosta - Ruíz, M. J. (1976b). Distribución de cobre y zinc en el mejillón californiano *Mytilus californianus* en la parte noroccidental de la Baja California. *Ciencias Marinas.* 3:18-23.
- Tates, A. D.; Neuteboom, I.; de Vogel, N.; y des Engelse, L. (1980). A micronucleus technique for

detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN,DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. Mutation Res. 74:11-20.

Von Ledebur, M y Schmid, W. (1973). The micronucleus test: Methodological aspects. Mutation Res. 19:109-117.

Wargovich, M. J; Goldberg, M. T; Newmark, H. L y Bruce W. R. (1983). Nuclear aberrations as a short - term test for genotoxicity to the colon: Evaluation of nineteen agents in mice. J. Natl. Cancer Inst. 71:133-137.

Wyllie, A. H; Kerr, J. F. R. y Currie, A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. Int. Review Cytol. 68:251-305.

Yamamoto, K. I. y Kikuchi, Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons Mutation Res. 71:127-131.

ANEXOS

TABLA IX

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	2.27	0.56	97.72	0.21	1.28	0.21
2	3.48	0.58	96.19	0.06	2.64	0.19
3	2.56	0.15	97.35	0.18	2.14	0.07
4	7.45	0.12	92.54	0.24	2.48	4.59
5	10.96	0.47	89.03	0.00	7.37	3.11
6	10.24	0.09	89.75	0.58	6.34	3.21
7	10.18	0.58	89.81	0.68	5.09	3.00
8	4.96	0.31	95.03	0.38	2.40	1.86
9	4.94	0.19	95.05	0.38	2.66	1.71
10	2.17	0.24	97.82	0.00	1.36	0.56
X	5.92	0.32	94.00	0.27	3.37	1.93

Información obtenida del primer muestreo correspondiente a los organismos colectados en el Km 105 carr. Tijuana-Ensenada.

Tratamiento: Colchicina 0.04% w/v y choque hipotónico.

TABLA X

MOJILLON	CEL. NORMAL (%GLOBAL)	P-NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RIFTURAS (%)
1	21.51	0.03	78.43	1.54	15.89	4.07
2	14.49	0.03	85.50	0.82	8.31	5.27
3	30.97	0.12	69.82	0.34	26.88	3.61
4	26.24	0.16	73.75	1.15	16.79	7.93
5	32.88	0.38	67.11	4.84	23.95	3.68
6	30.34	0.29	69.75	0.59	22.28	7.16
7	22.29	0.03	77.70	0.42	19.10	15.28
8	11.61	0.03	88.38	2.178	5.98	3.44
9	18.24	0.49	81.75	0.69	13.80	3.25
10	19.62	0.19	80.37	2.44	15.62	1.36
X	22.81	0.17	77.19	1.52	16.86	5.50

Información obtenida del primer muestreo correspondiente a los organismos colectados en el rompecolas.

Tratamiento: Colchicina 0.04% w/v y choque hipotónico.

TABLA XI

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ-NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	32.8	0.11	67.17	1.05	27.19	4.45
2	20.07	0.00	79.92	3.68	12.96	3.43
3	15.75	0.20	84.22	0.99	12.20	2.36
4	16.69	0.09	83.24	0.90	13.47	2.23
5	19.38	0.086	80.60	0.86	16.63	1.81
6	19.78	0.16	80.21	2.28	15.96	1.38
7	12.52	0.097	87.46	2.72	8.26	1.45
8	17.92	0.170	85.94	2.13	13.49	2.13
9	12.88	0.71	87.09	1.25	9.31	1.61
10	21.36	0.185	78.61	5.00	11.43	4.75
X	18.91	0.10	81.09	2.00	14.09	2.56

Información obtenida del primer muestreo correspondiente a los organismos colectados en punta banda.

Tratamiento: Colchicina 0.04% w/v y choque hipotónico.

TABLA XII

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	7.69	0.18	92.30	1.23	3.51	2.75
2	9.83	0.00	89.97	0.85	4.63	4.35
3	6.92	0.17	71.40	0.78	2.80	3.15
4	11.46	0.00	88.43	2.27	4.94	4.24
5	10.57	0.12	89.42	1.36	3.23	5.84
6	5.04	0.00	94.95	0.70	1.06	3.27
7	11.43	0.00	88.56	0.51	6.79	4.04
8	4.07	0.00	95.92	0.77	1.26	2.03
9	4.06	0.00	94.48	1.54	2.03	1.93
10	9.90	0.00	90.00	1.18	6.09	2.63
X	8.09	0.055	91.91	1.11	3.63	3.42

Información obtenida del primer muestreo correspondiente a los organismos colectados en el Ejido Erendira B.C.

Tratamiento: Colchicina 0.04% w/v y choque hipotonico.

TABLA XIII

HEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	20.77	0.19	79.22	1.44	16.71	2.41
2	7.89	0.00	92.10	1.31	5.67	0.90
3	17.10	0.17	82.89	2.65	10.69	3.59
4	19.11	0.00	80.78	1.60	15.01	2.50
5	17.36	0.00	82.63	4.86	9.07	3.42
X	16.44	0.072	83.52	2.37	11.43	2.56

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en el Km 105 carr. Tijuana-Ensenada.

Tratamiento: Colchicina y choque hipotonico.

TABLA XIV

HEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	25.54	0.07	74.45	3.21	20.29	1.16
2	24.06	0.25	75.93	2.79	20.59	0.42
3	9.21	0.21	92.90	2.11	6.56	0.31
4	44.51	0.00	55.48	4.57	37.06	2.87
5	14.29	0.27	85.70	2.91	9.19	1.91
X	23.52	0.32	76.48	3.11	18.73	1.33

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en el Km 105 carr. Tijuana-Ensenada.

Sin tratamiento.

TABLA XV

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	29.09	0.00	70.90	4.68	17.99	6.41
2	25.76	0.00	73.93	2.87	18.92	3.96
3	21.21	0.00	78.78	6.20	12.80	2.19
4	33.61	0.00	66.38	5.26	24.38	3.97
5	24.10	0.00	75.89	2.15	19.51	2.42
X	26.75	0.00	73.25	4.23	18.72	3.79

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en la zona del rompeolas.

Tratamiento: Colchicina y choque hipotónico.

TABLA XVI

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	12.30	0.31	87.69	4.73	7.25	0.00
2	30.97	0.29	69.02	7.07	18.73	4.86
3	34.06	0.18	65.93	4.29	27.48	2.10
4	46.49	0.23	53.50	2.95	42.21	1.09
5	32.71	0.50	67.28	6.07	24.53	1.60
X	31.30	0.30	68.70	5.02	24.04	1.93

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en la zona del rompeolas.

Sin tratamiento.

TABLA XVII

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	13.80	0.00	86.19	1.93	11.48	0.38
2	11.12	0.00	88.87	2.04	7.77	0.98
3	20.39	0.00	79.60	3.23	15.63	1.52
4	21.97	0.10	78.02	1.89	19.03	0.94
5	13.22	0.09	86.77	0.69	10.83	1.59
X	16.1	0.038	83.90	1.95	12.94	1.00

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en Punta Banda.

Tratamiento: Colchicina y choque hipotonico.

TABLA XVIII

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	40.18	0.11	59.81	3.38	36.56	0.11
2	23.80	0.19	76.19	4.16	17.36	2.08
3	52.75	0.13	47.24	10.74	39.25	2.61
4	47.92	0.19	52.07	5.04	41.58	1.08
5	48.43	0.30	51.56	5.25	40.34	2.52
X	42.61	0.18	57.39	5.71	35.02	1.68

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en Punta Banda.

Sin tratamiento.

TABLA XIX

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	19.58	0.00	80.00	3.23	13.19	3.07
2	20.74	0.00	79.16	5.07	13.58	2.08
3	20.64	0.09	79.35	1.76	15.65	3.13
4	21.56	0.00	78.43	6.73	11.50	3.32
5	20.64	0.09	79.15	4.71	12.48	3.34
X	20.63	0.052	79.37	4.3	13.28	5.98

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en el ejido Erendira B.C.

Tratamiento: Colchicina y choque hipotónico.

TABLA XX

MEJILLON	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
1	15.96	0.21	84.03	3.96	11.36	0.42
2	32.38	1.03	67.61	2.84	26.42	2.07
3	19.05	0.27	80.94	3.60	14.70	0.46
4	6.21	0.59	93.78	2.07	3.25	0.29
5	12.24	0.35	87.75	1.78	7.77	2.32
X	17.16	0.49	82.84	2.85	12.7	1.11

Información obtenida del segundo muestreo correspondiente a los organismos colectados en el ejido Erendira B.C.

Sin tratamiento.

TABLA XXI

ZONA	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
P ₁ Km.105	5.92	0.32	94.08	0.27	3.37	1.93
P ₂ Rompeolas	22.81	0.17	77.19	1.52	16.86	5.50
P ₃ Ej.Erendira	8.09	0.055	91.91	1.11	3.63	3.42
P ₄ Pta.Banda	18.91	0.18	81.09	2.08	14.09	2.56

Análisis de células interfásicas correspondiente al primer muestreo (dic.1989).

Bajo mismo tratamiento (colch.0.04% y choque hipotónico 25%).

(datos promedio).

TABLA XXII

ZONA	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
P ₁ Km.105	16.44	0.072	83.56	2.37	11.43	2.56
P ₂ Rompeolas	26.75	0.000	73.19	4.23	18.72	3.79
P ₃ Ej.Erendira	20.63	0.052	79.25	4.3	13.28	5.98
P ₄ Pta.Banda	16.1	0.038	83.90	1.95	12.94	1.08

Análisis de células interfásicas correspondiente al 50% de los organismos colectados en el segundo muestreo (abril,1990).

Tratamiento con colchicina 0.04% y choque hipotónico 25%

(datos promedio).

TABLA XXIII

ZONA	CEL. ANORMAL (%GLOBAL)	μ -NUCLEOS (%)	CEL. NORMAL (%)	RETICULADOS (%)	HETEROPIC. (%)	RUPTURAS (%)
P ₁ Km.105	23.52	0.32	76.48	3.11	18.73	1.33
P ₂ Rompeolas	31.30	0.30	68.70	5.02	24.04	1.93
P ₃ Ej.Erendira	17.16	0.49	82.84	2.85	12.7	1.11
P ₄ Pta.Banda	42.61	0.18	57.39	5.71	35.02	1.68

Análisis de células interfásicas correspondiente al 50% de los organismos colectados en el segundo muestreo (abril, 1990).

Tratamiento sin colchicina 0.04% y sin choque hipotónico 25%.

(datos promedio).