

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**DESCRIPCION DE LA FRECUENCIA DE ANORMALIDADES Y CARACTERIZACION MORFOLOGICA DEL NUCLEO DE ERITROCITOS DE TORTUGA VERDE (*Chelonia mydas*) A TRAVES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN 3 DIFERENTES ZONAS DE ESTUDIO EN QUINTANA ROO, MEXICO.**

**POR:**

**AIDA MERCEDES GUEVARA MELENDEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 3 DE NOVIEMBRE DEL 2021**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**DESCRIPCION DE LA FRECUENCIA DE ANORMALIDADES Y CARACTERIZACION MORFOLOGICA DEL NUCLEO DE ERITROCITOS DE TORTUGA VERDE (*Chelonia mydas*) A TRAVES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN 3 DIFERENTES ZONAS DE ESTUDIO EN QUINTANA ROO, MEXICO.**

**POR:**

**AIDA MERCEDES GUEVARA MELENDEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 3 DE NOVIEMBRE DEL 2021**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**



**Universidad de El Salvador**  
*Hacia la libertad por la cultura*

**DESCRIPCION DE LA FRECUENCIA DE ANORMALIDADES Y CARACTERIZACION MORFOLOGICA DEL NUCLEO DE ERITROCITOS DE TORTUGA VERDE (*Chelonia mydas*) A TRAVES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN 3 DIFERENTES ZONAS DE ESTUDIO EN QUINTANA ROO, MEXICO.**

**POR:**

**AIDA MERCEDES GUEVARA MELENDEZ**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 3 DE NOVIEMBRE DEL 2021**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR:**

**MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO**

**SECRETARIO GENERAL:**

**ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DECANO:**

**ING. AGR. Msc. FRANCISCO LARA ASCENCIO**

**SECRETARIO:**

**ING. BALMORE MARTINEZ SIERRA**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**

**MV. RICARDO ERNESTO GAMERO GUANDIQUE**


F. \_\_\_\_\_

**DOCENTES DIRECTORES**

**MVZ. FERNANDO JAVIER FLORES ALVARENGA**

F.  \_\_\_\_\_

**Dr. VANESSA LABRADA MARTAGON**

F.  \_\_\_\_\_

**COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION**

**MVZ. M. SP. MARIA JOSÉ VARGAS ARTIGA**

F. \_\_\_\_\_

## RESUMEN

Los micronúcleos y anomalías nucleares son biomarcadores de genotoxicidad en fauna silvestre causada por la biodisponibilidad y exposición a agentes químicos en el ambiente, siendo este un indicativo de probables alteraciones a la salud tales como mutaciones y/o carcinogénesis. La costa de Quintana Roo representa una zona de alta importancia para la anidación, desarrollo y crecimiento de diversas especies de tortugas marinas, las cuales se encuentran clasificadas en la lista roja de la unión mundial para la naturaleza de la IUCN (Unión Internacional para la conservación de la naturaleza) como en peligro de extinción o en peligro crítico de extinción. Sin embargo, es un hábitat altamente perturbado por la industria turística en constante crecimiento. El objetivo general de este trabajo fue caracterizar las anomalías nucleares en eritrocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*), así como también, cuantificar su frecuencia en los individuos capturados en el año 2019. Para lo anterior se utilizaron muestras de especímenes que habitan en diferentes áreas de alimentación (Akumal, Xcalak y Punta Herrero) y se empleó el protocolo de tinción de células específico para la observación de ácidos nucleicos en tortugas marinas, para la determinación de anomalías nucleares en sangre periférica de tortugas marinas. Dicha técnica genera resultados óptimos de manera sencilla y no invasiva permitiéndonos obtener resultados para el entendimiento de patologías que afectan a la especie y evaluar posibles daños en el ecosistema que afectan en el desarrollo de los individuos. Así mismo, nos brindará información clave para investigaciones posteriores en el área de la ecotoxicología de especies marinas amenazadas. Siendo El Salvador el segundo país más importante, después de México, para la preservación de los quelonios marinos, esta investigación es importante para lograr la protección de la biodiversidad y protección de los ecosistemas marinos que nos conectan, además, la metodología aquí empleada podrá ser aplicada a futuro en poblaciones de tortugas marinas de nuestro país.

En este estudio se caracterizan por primera vez en tortugas marinas diferentes tipos de anomalías nucleares clasificados como núcleos lobulados, con muesca, con ampolla y en forma de ocho. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos ( $H=2.98$ ,  $p=0.22$ ), buds ( $H=2.66$ ,  $p=0.26$ ) y anomalías nucleares ( $H=3.13$ ,  $p=0.20$ ) entre las zonas de estudio. Aunque, la proporción de tortugas marinas afectadas, con micronúcleos, es mayor en la Bahía de Akumal ( $n=4$ ), mientras que la frecuencia de buds y otro tipo de anomalías nucleares se presentó en mayor proporción en tortugas de Bahía de Xcalak ( $n=13$ ) y Punta Herrero ( $n=14$ ), en donde al menos el 50% de los animales capturados presentaron 22 y 12 anomalías  $2000^{-1}$  eritrocitos respectivamente, con 40 y 29 buds  $2000^{-1}$  eritrocitos, mientras que en Akumal fue de 24 buds y 8.5 anomalías en  $2000^{-1}$  eritrocitos. Los resultados sugieren que Akumal sigue siendo la zona más afectada con daño genotóxico (presencia de micronúcleos en eritrocitos),

probablemente asociado al incremento de toxinas derivadas de las actividades turísticas que generan contaminación marina. No se encontró una correlación entre las tallas de las tortugas blancas y la frecuencia de los diferentes tipos de anomalías en eritrocitos cuando se analizaron a las tortugas marinas de todas las zonas (MN  $r=0.07$ , buds  $r=0.06$ , anomalías  $r=0.08$ ). No fue posible la evaluación de la enfermedad de fibropapilomatosis debido al tamaño de muestra y los pocos especímenes afectados. Los diferentes tipos de anomalías nucleares clasificados fueron: núcleos lobulados, con muesca, con ampolla y en forma de ocho.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de El Salvador (UES) por la formación profesional adquirida en los años de estudio, la cual fue clave para despertar mi pasión por la Medicina Veterinaria y el bienestar humano.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) por darme esta oportunidad y poder crear lazos académicos que puedan permitir abrir las puertas y la colaboración entre Universidades y estudiantes con el deseo de expandir sus conocimientos.

A la Dra. Vanessa Labrada Martagón, responsable del Laboratorio Ecología de la Salud, Facultad de Ciencias, UASLP, por compartir sus conocimientos y permitirme colaborar en temas de importancia en la conservación de las especies de tortugas marinas y la conservación de nuestro ecosistema, y también por brindarme ayuda más allá de sus deberes profesionales y por compartir un poco de su hermosa cultura y costumbres.

Al Dr. Mauricio Comas, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSAB), UASLP y al estudiante Ricardo E. Martínez, por la asesoría brindada y la toma de datos microscópicos para la medición del índice de redondez.

A mi asesor MVZ. Fernando Javier Flores por brindarme un poco de sus conocimientos, por su guía para permanecer estable en cada proceso de este viaje académico y por su apoyo incondicional.

A mi familia que siempre estuvo presente para apoyarme en cada paso de este proceso, principalmente a mi madre la cual estuvo ahí para aconsejarme en los momentos difíciles.

A mis amigos que conocí durante mi carrera Javier, Stephanie, Blanca, Erika, Marcela, Moisés porque su amistad me ayudo a poder seguir con mis proyectos y con ellos aprendí por medio de sus experiencias.

Agradecer a todas aquellas personas que sin conocerme en un país extranjero me abrieron sus puertas, me brindaron su amistad y me dieron fuerzas para seguir adelante en mi camino profesional.



## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por darme fuerza y valentía para enfrentar cada obstáculo para poder terminar mi carrera

### **A mi familia**

A mi madre y mis hermanos que siempre me apoyaron en mis proyectos y han sido mi ejemplo a seguir para ser mejor.

### **A mis maestros**

Por brindarme consejos, sabiduría y guiarme en cada paso para poder culminar mi carrera.

### **A mi asesora externa**

Por brindarme todos sus conocimientos, ayuda en nuevas investigaciones y conocimientos de nuevas técnicas de estudio que tienen impacto en la vida de las tortugas marinas y todo su ecosistema y por darme esas ganas de querer seguir aprendiendo más para poder crear una diferencia en el mundo y ayudar a especies en peligro de extinción.

### **A mis amigos**

Por apoyarme con palabras, sabiduría, ejemplos y sobre todo por brindarme una amistad la que sin la cual hubiera sido todo más difícil.

Y a mí misma, por ser consistente, por no tener miedo a errar y por tener paciencia en este largo camino que apenas comienza.

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	VIII
RESUMEN.....	IV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	3
2.1 Antecedentes .....	3
2.2 Morfología de eritrocitos de tortugas marinas .....	5
2.3 Micronúcleos (MN) .....	7
2.4 Otras anomalías nucleares (AN) por agresiones genotóxicas o citotóxicas.....	8
3. JUSTIFICACION .....	12
4. HIPÓTESIS .....	13
5. OBJETIVOS .....	13
5.1 Objetivo General.....	13
5.2 Objetivos específicos.....	13
6. METODOLOGÍA.....	14
6.1 Tipo de estudio .....	14
6.2 Zona de estudio .....	14
6.3 Captura de los organismos.....	16
6.4 Obtención de muestras biológicas .....	16
6.5 Análisis de laboratorio .....	17
6.5.1 Conteo de anomalías nucleares .....	17
6.6 Morfología de membrana celular en anomalías nucleares .....	18
7. ANALISIS ESTADISTICOS .....	21
8. RESULTADOS .....	22
8.1 Estructura poblacional .....	22
8.2 Anomalías nucleares .....	23
8.3 Morfología de anomalías nucleares .....	28
9. DISCUSION .....	30
9.1 Estructura poblacional .....	30
9.2 Prevalencia de fibropapilomatosis .....	30

9.3	Anormalidades nucleares .....	31
9.4	Morfología de anomalías nucleares .....	35
10.	CONCLUSIONES .....	37
11.	RECOMENDACIONES .....	39
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
13.	ANEXOS.....	55

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eritrocitos de crías de Laúd .....	6
<b>Figura 2.</b> a) Morfología en eritrocitos de tortuga marina.....	6
<b>Figura 3.</b> Eritrocito de tortuga acuática ( <i>Pseudemys scripta elegans</i> ).....	7
<b>Figura. 4.</b> Micrografía electrónica de transmisión de un eritrocito de una tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) .....	7
<b>Figura 5.</b> a. Células Normales, b. núcleo normal, c. Célula micronucleada (CMN); flecha micronúcleo (MN); d. Célula binucleada (BN), e. Cariorrexis (CR); f. Cromatina condensada (CC) .....	10
<b>Figura 6.</b> g-h. Núcleo lobulado típico (NL); Núcleo lobulado, i. Núcleo picnotico, flecha (PN); j. Cariolisis (CL) .....	11
<b>Figura 7.</b> Estado de Quintana Roo.....	15
<b>Figura 8.</b> Clasificación del tipo de núcleos .....	20
<b>Figura 9.</b> Largo curvo del caparazón (LCC) de la tortuga verde ( <i>C. mydas</i> ) por zonas de estudio .....	23
<b>Figura 10.</b> Anormalidades identificadas en sangre periférica de tortuga verde ( <i>C. mydas</i> ) de la costa de Quintana Roo .....	24
<b>Figura 11.</b> Frecuencia de a) MN, b) buds y c) anormalidades presentes en 2000 eritrocitos de tortuga verde ( <i>C. mydas</i> ) por zona de estudio.....	27
<b>Figura 12.</b> Índice de redondez en eritrocitos de tortuga verde ( <i>C. mydas</i> ) de dos zonas de estudio en Quintana Roo.....	28
<b>Figura 13.</b> Índice de redondez en eritrocitos de tortuga verde ( <i>C. mydas</i> ) de dos zonas de estudio en Quintana Roo.....	29

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Largo curvo de caparazón (LCC) de la tortuga blanca ( <i>C. mydas</i> ) por zonas de estudio.....	22
Tabla 2. Frecuencia de Micronúcleos (MN), buds y anormalidades nucleares (AN) en sangre periférica de tortuga blanca ( <i>C. mydas</i> ) en 3 zonas de estudio en Quintana Roo.....	25

## **INDICE DE ANEXOS**

Anexo-1. Capacitación para el procesamiento de las muestras previamente colectadas en el estado de Quintana Roo.....	55
Anexo-2. Tinción de muestras. ....	55
Anexo-3. Preparación de buffers.....	56
Anexo-4 Toma de fotografías en microscopio de fluorescencia. ....	56
Anexo-5. Conteo de anomalías nucleares por medio de fotografías digitales de microscopio de fluorescencia de alta resolución. ....	57

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los mares y de los ecosistemas costeros es una de las amenazas más importantes para las tortugas marinas, influenciando negativamente a sus poblaciones (Sakai et al. 2000, Maffucci et al. 2005). Existe una preocupación creciente sobre los posibles efectos nocivos que tienen los contaminantes persistentes sobre la fauna marina de estos ecosistemas, principalmente en especies de vida longeva como mamíferos, algunas aves y tortugas marinas, por la gran capacidad de acumular y biomagnificar algunos elementos como metales pesados y pesticidas organoclorados (Anan et al. 2001, Gauthier et al. 2003).

Con excepción de algunas especies, las investigaciones ecotoxicológicas en reptiles son escasas (Hopkins 2000). En el caso de las tortugas marinas, la información sobre el efecto negativo de los contaminantes y el estado de salud de estos organismos ha ido en aumento, estudios sugieren incluso una mayor exposición a contaminantes químicos peligrosos en tortugas verdes que en otras especies de tortugas marinas (Camacho et al. 2014), pero la información sobre niveles basales de efecto es aún limitada (Hamann et al. 2010, Rees et al. 2016). Se ha determinado que los reptiles, incluidas las tortugas marinas, son buenos bioindicadores de contaminación química debido a su amplia distribución ecológica, sensibilidad fisiológica, longevidad y fidelidad a los sitios en donde viven (Bishop et al. 1995, Crain y Guillette 1998, Clark et al. 2000, Golet y Haines 2001, Labrada-Martagón et al. 2011).

Para evaluar el estado de salud del ambiente natural y determinar los efectos de los contaminantes en especies amenazadas o en peligro de extinción, debemos utilizar especies centinelas y biomarcadores como herramientas (Labrada 2018). El monitoreo de la exposición a contaminantes y de los efectos fisiológicos y clínicos que generan en los organismos a través del uso de biomarcadores, permite identificar estados susceptibles de los organismos y el aumento en la prevalencia de enfermedades de manera temprana que pudieran afectar no sólo a la población y a la biodiversidad de los ecosistemas, sino también poner en riesgo la salud de la población humana cuando se trata de especies de importancia comercial (Labrada 2018). El objetivo principal de este trabajo es caracterizar morfológicamente las anomalías nucleares en eritrocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) por medio de microscopia de fluorescencia y cuantificar la frecuencia de esas anomalías nucleares en distintos sitios de alimentación en la costa de Quintana Roo. Dicha información será útil para determinar daño genético indicativo a periodos largos de estrés toxicológico (Casini 2018) y así en un futuro poder asociar

genotoxicidad a patologías diversas que afectan a las tortugas marinas y otras especies vulnerables a los cambios climáticos y la contaminación generada por el hombre, así también en nuestro país El Salvador es importante ya que es una herramienta que puede ayudar en la protección de la biodiversidad y protección de los ecosistemas marinos que nos conectan con México y que son parte del ciclo de vida de las tortugas marinas.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Antecedentes

En 1975 la prueba de micronúcleos fue utilizada por primera vez por Schmid en médula ósea de ratones utilizando altas dosis de agentes que causan ruptura cromosómica, esto fue el inicio de muchas otras investigaciones tanto en humanos (Peace y Succop 1999) como en animales de vida silvestre para evaluar el efecto de contaminantes ambientales como pesticidas, metales pesados, químicos de industrias, etc., (Zúñiga et al. 2000, Souto et al. 2018) lo cual ha sido de ayuda para el entendimiento de los efectos que causa el estrés ambiental a lo largo del tiempo.

En cuanto a especies marinas estudios como el de Zúñiga y colaboradores (2000) realizaron prueba de micronúcleos en 54 especies animales para determinar aquellos que podrían catalogarse como especies centinelas de eventos genotóxicos, pero solamente se utilizó una especie de tortuga (*Macrochelys temminckii*) obteniendo resultados negativos en el estudio, lo cual no es significativo para este grupo de reptiles. Rodríguez Salazar (2018) realizó una investigación en la que se asoció la ausencia o presencia de fibropapilomatosis con la frecuencia de anomalías nucleares en eritrocitos, obteniendo como resultado que en las zonas más densamente habitadas y con alto impacto turístico (Punta Arenas y Bahía Akumal) es en donde se presentó una mayor prevalencia de fibropapilomatosis y mayor frecuencia de micronúcleos en las tortugas verdes (*C. mydas*) estudiadas. Se realizaron además asociaciones en la frecuencia de las anomalías y variables bióticas como el tamaño de los organismo, edad y sexo, llegando a la conclusión que esta tortuga marina es una buena especie para monitorear la biodisponibilidad de contaminantes ambientales y la calidad del agua en su medio ambiente a través de la prueba de MN. Carneiro y colaboradores (2016) determinaron en un estudio en tortugas verdes en Brasil que altos niveles de Cu, Fe y Pb están implicados en la etiología de la fibropapilomatosis a través de la generación de estrés oxidativo, obteniendo valores basales con respecto a la presencia de MN para dicha población.

En tortugas marinas se han realizado estudios diversos para evaluar efectos genotóxicos, entre los más importantes están el ensayo cometa o electroforesis en gel de celda única, (Caliani et al. 2014), así también como un estudio sobre las correlaciones entre las actividades de las enzimas antioxidantes y la concentración de xenobióticos presentes en sangre de tortugas verdes en la península de Baja California Sur (Labrada et al. 2011). Estudios en los cuales se ha indicado sensibilidad fisiológica de las tortugas a químicos presentes en su hábitat, como lo demuestra también Camacho y colaboradores (2014) detectando la presencia de



más de 50 contaminantes orgánicos e inorgánicos en sangre de tortugas juveniles. Razón por la cual la investigación de MN sigue siendo necesaria como técnica no invasiva para el control de ecosistemas y especies en peligro de extinción. Recientemente ya se cuenta con una técnica estandarizada para la prueba de micronúcleos en sangre de tortugas marinas (Labrada et al. 2019).

Actualmente, la disminución de las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas se da como resultado de la contaminación química y de otros factores de origen antrópico (como las pesquerías, turismo, agricultura y cambio climático) (Labrada 2018). El cambio climático se ha convertido en una de las principales amenazas para la biodiversidad y los procesos biológicos (Santidrián 2011), lo cual ha sido estudiado con el fin de desarrollar planes de conservación realistas y eficaces (Hopkins 2000). El océano es el destino final de numerosas sustancias químicas persistentes transportadas por los ríos y drenajes desde el interior de los continentes y zona costera, se ha recalcado la necesidad de dilucidar las diferentes asociaciones existentes entre dichos elementos y los organismos vivos con los que interactúan (Hopkins 2000).

Para evaluar e interpretar mejor el estado de salud de los individuos hay estudios que evalúan simultáneamente marcadores biológicos (hematológicos, endocrinos, estrés oxidativo, etc.) para generar una interpretación más completa del estado de salud de los organismos y la respuesta metabólica y fisiológica que están presentando ante las alteraciones ambientales, para así evitar que efectos adversos continúen afectando a una especie en específico o al ecosistema completo (Stegeman et al. 1992, Schlenk y Di Giulio 2002).

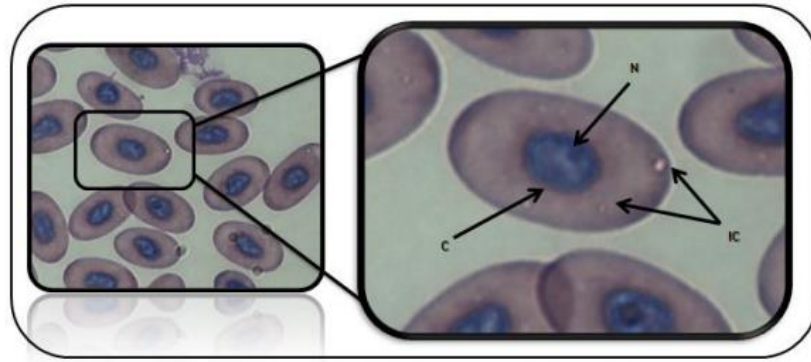
Existen estudios en los que se ha comparado la frecuencia de micronúcleos (MN) en diversas especies y grupos de animales en cautiverio, tales como mamíferos, reptiles y aves (Zúñiga et al. 1996, Poletta 2008, Souto et al. 2018). Sin embargo, los reportes e información sobre la frecuencia de anormalidades nucleares en fauna silvestre son escasos y más aún cuando se trata de animales en vida libre (Poletta 2008, Baesse et al. 2015). El grupo más estudiado es el de los anfibios, moluscos y peces (Barsiene 2006, Caraffa 2013, Furnus et al. 2014). Diversos estudios han realizado la prueba de micronúcleos utilizando a los peces como especies centinelas tanto in vitro como en vida libre principalmente para evaluar la calidad y sostenibilidad del medio ambiente (Ortegón 2014, Furnus et al. 2014). In vitro se han realizado investigaciones en los cuales se expone a los peces a un tiempo determinado y a cantidades específicas de contaminantes para luego evaluar por medio de muestreo sanguíneo periférico la morfología nuclear y determinar daño genético por diversos contaminantes derivados de actividades antrópicas (Barsiene 2006). Este grupo ha resultado adecuado para medir el grado de genotoxicidad del agua en ambientes dulceacuícolas y marinos, así como el daño que generan los

mutágenos ambientales sobre el material genético tales como, herbicidas, insecticidas, metales pesados y desechos radioactivos, entre otros debido a su sensibilidad a bajas concentraciones de sustancias genotóxicas y a la información importante que pueden brindar debido a su posición en la cadena trófica (Grisolia y Torres-Cordeiro 2000, Hoshina et.al. 2008).

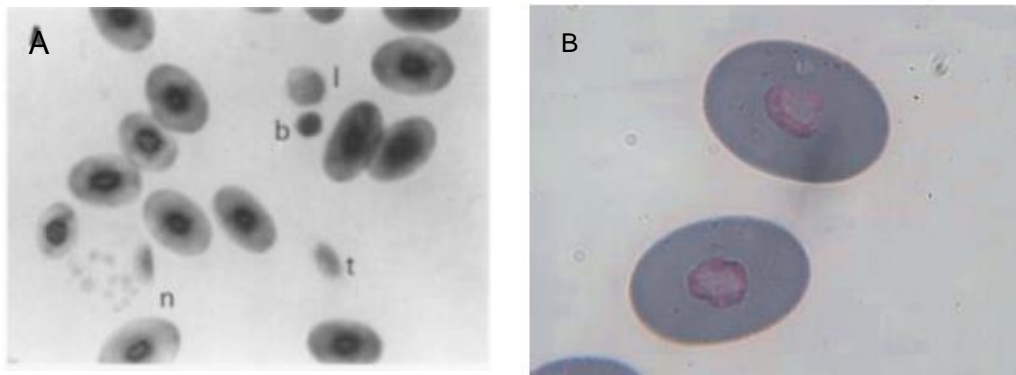
## **2.2 Morfología de eritrocitos de tortugas marinas**

La descripción de las características morfológicas de las células sanguíneas en tortugas marinas son escasas (Gaumer y Goodnight 1957, Wood y Ebanks 1984). Urgutas y colaboradores (2003) detallaron la morfología de algunas tortugas en Turquía detallando que los eritrocitos o glóbulos rojos son células nucleadas, ovals con sus núcleos también ovals que están ubicados centralmente como los de otras especies de reptiles. Lo que varía es la longitud y anchura entre especies, tienen un citoplasma naranja verdoso pálido y el núcleo morado azulado al ser observados bajo tinción de Romanowsky (Work et al. 1998, Montaña 2013) (Fig.1). En el caso de los eritrocitos inmaduros estos se describen como células con formas de redonda a oval, su núcleo es heterocromático grande y redondo, el citoplasma es ortocromático y pueden ser más pequeños que los eritrocitos maduros. En general los eritrocitos de las tortugas marinas son los más grandes en relación con la mayoría de los reptiles (Ramírez et al. 2012) (Fig.2).

Como es habitual en otros parámetros fisiológicos de los reptiles, el recuento total de eritrocitos varía con las condiciones ambientales, el estado nutricional, el sexo (algunos machos tienen mayor número que las hembras) y la estación (más altos antes de la hibernación y más bajos justamente después) (Wood y Ebanks 1984). Sin embargo, desde que se comenzó a describir morfológicamente las células de estas especies, se notaron inclusiones, las cuales eran muy grandes para ser partículas virales y tampoco bacterias porque no tenían membrana celular, así que se detallaron solamente como organelos degenerativos (Work et al. 1998, Casal et al. 2007), lo que ahora ya se clasificó y se conocen como micronúcleos también llamados cuerpos de Howell Jolly. (Schmid 1975, Sears et al. 2012).

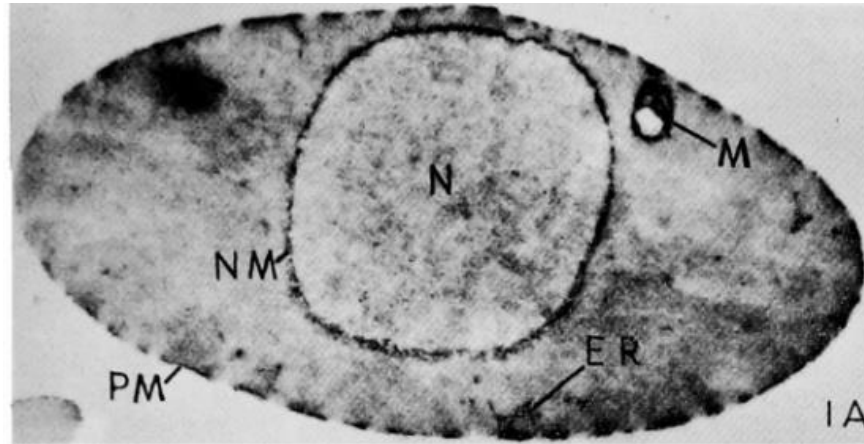


**Figura 1.** Eritrocitos de crías de Laúd (*Dermochelys coriácea*): Núcleo (N); inclusiones intracitoplasmáticas (IC); citoplasma (C) tomado de (Montaño 2013).

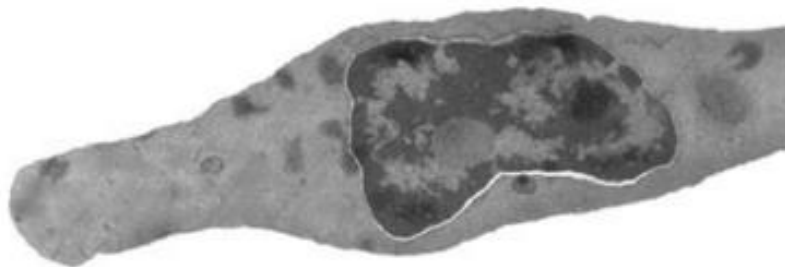


**Figura 2.** a) Morfología en eritrocitos de tortuga marina verde (*C. mydas*) (Wood y Ebanks 1984). b) eritrocitos maduros de *Lepidochelys olivacea* en un frotis teñido con Wright (100x) tomado de (Ramírez et al. 2012).

En cuanto a la descripción de las células por medio de microscopía electrónica, Taylor y colaboradores (1968) describen los eritrocitos con forma convexa presentando una membrana plasmática con bordes regulares, textura suave y aparentemente porosa y con citoplasma homogéneo, con respecto al núcleo se describe con forma oval y con membrana nuclear con bordes regulares y textura áspera (Fig. 3 y 4). Casal y colaboradores (2007) detallan que ciertos eritrocitos tienen pequeñas inclusiones intracitoplasmáticas pleomórficas y electro densas que se consideraron como organelos degenerados que también suelen presentarse en otras especies de reptiles (Work et al. 1998).



**Figura 3.** Eritrocito de tortuga acuática (*Pseudemys scripta elegans*). Notar los poros en la membrana plasmática (PM), y la membrana nuclear (NM) núcleo (N) retículos endoplasmáticos (ER) están dispersados al azar en todo el citoplasma. mitocondrias (M). x15,600. Tomado de (Taylor et al. 1968).



**Figura. 4.** Micrografía electrónica de transmisión de un eritrocito de una tortuga boba (*Caretta caretta*) Bar = 1.05  $\mu$ c. tomado de (Casal et al. 2007).

### 2.3 Micronúcleos (MN)

La prueba de micronúcleo fue validada a nivel mundial en 1999 por el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), con la participación de 42 laboratorios (aproximadamente 16,500 individuos de diferentes poblaciones del mundo) (Matheus Lobo y Bolaños 2014, Bolognesi et al. 2013).

La prueba de micronúcleos (MN) es una técnica in vivo no invasiva, sensible y económica para la determinación de genotoxicidad que puede ser útil en estudios ecotoxicológicos para determinar la biodisponibilidad de contaminantes químicos en el ambiente, así como exposición crónica en fauna silvestre (Lee Rangel et al. 2016). Esta prueba difiere entre especies ya que depende de la efectividad del bazo (o del resto del sistema reticuloendotelial) (Zúñiga et al. 2000) y se encarga de detectar los efectos de los agentes mutagénicos en los cromosomas mediante la identificación de cromosomas rezagados y fragmentos excéntricos que permanecen separados del núcleo (Poletta 2008).

Los micronúcleos y brotes nucleares que son considerados como anormalidades nucleares se expresan en células en división que contienen roturas cromosómicas que carecen de centrómeros (fragmentos excéntricos) y/o cromosomas completos que no pueden viajar a los polos del huso durante la mitosis en el anafase (Fenech 2000). Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas (Schmid 1975). Este proceso puede producirse equivocadamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN causando roturas cromosómicas que pueden ser por efecto de la radiación y/o sustancias genotóxicas, lo que trae como consecuencia, pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo (Shugart 2000). Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos hijos. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio óptico (Schmid 1975, Fenech 2000).

Estas células con anormalidades nucleares se clasifican de acuerdo a diferentes criterios, en el caso de las células micronucleadas estas presentan uno o más MN de un tamaño de 1/3 a 1/16 del núcleo principal, tienen la misma textura e intensidad de tinción y están claramente separados del núcleo (Bolognesi et al. 2013). Las prolongaciones o brotes nucleares tienen las mismas dimensiones que los micronúcleos y hay ocasiones en que pueden ser del mismo tamaño o más grandes que el núcleo principal, la diferencia es que estas prolongaciones están unidas al núcleo por un puente nucleoplasmático (Bolognesi et al. 2013).

#### **2.4 Otras anormalidades nucleares (AN) por agresiones genotóxicas o citotóxicas.**

Además de los MN también se describen otras AN, las que además de ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, son

indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular (Tolbert 1991). Las alteraciones más indicativas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo, donde las modificaciones que puede sufrir este son en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Entre estas AN se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), núcleo picnótico (NP), cariolisis (CL), núcleo lobulado también llamado prolongación nuclear, "bud cell" o "broken eggs" (NL) y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN) (Torres y Ramos 2013). A continuación se describen cada una de las AN:

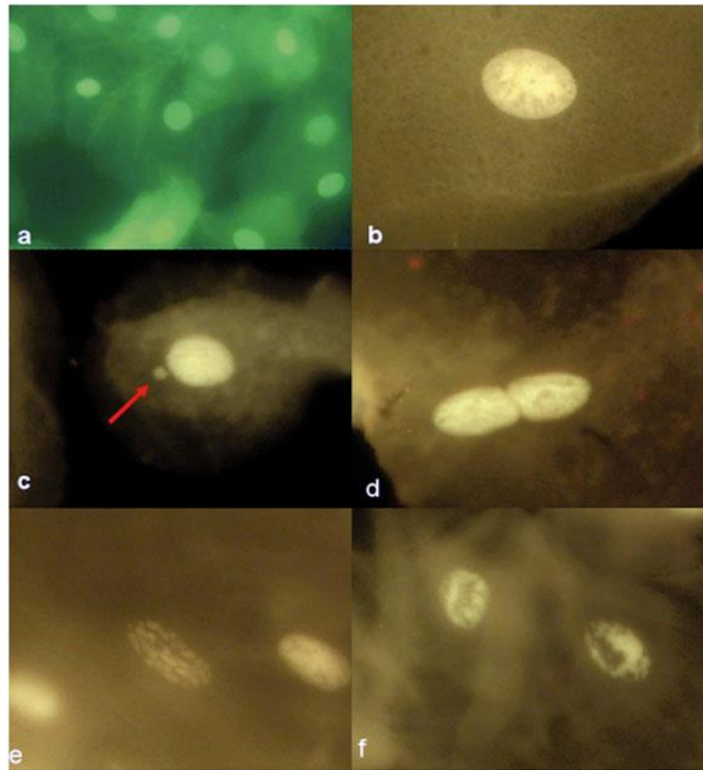
Células Normales (CN): el núcleo está uniformemente teñido, es redondo u oval. No contienen ningún otro cuerpo o estructura aparte del núcleo que contenga ADN, estas células son consideradas como células totalmente diferenciadas y no se observan divisiones celulares (Tolbert et al. 1991, Thomas et al. 2009) (Fig. 5a y 5b).

Célula Micronucleada (MN): se caracteriza por la presencia de un núcleo principal y uno o más pequeñas estructuras nucleares denominadas MN. Un MN tiene la forma redonda o almendrada y mide entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, presenta la misma intensidad y coloración de tinción, textura y plano focal que el núcleo y no está conectado al núcleo principal (Tolbert et al. 1991, Thomas et al. 2009, Bolognesi et al. 2013) (Fig. 5c).

Célula binucleada (BN): las células binucleadas tienen dos núcleos con el mismo tamaño, morfología, textura e intensidad de tinción (Bolognesi et al., 2013). No parecen implicar una interacción directa con el ADN, sino que involucra la interferencia con los hechos ocurridos a finales de la división celular (Tolbert et al. 1991, Shi & King 2005, Thomas et al. 2009) (Fig. 5d).

Cariorrexis (CR): células que presentan un núcleo que se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear. Con respecto a las células de cromatina condensada, ellas tienen un patrón moteado nuclear indicativo de la fragmentación nuclear conducente a la eventual desintegración del núcleo. Estas células tal vez están pasando por una fase avanzada de apoptosis pero esto aún no ha sido comprobado (Thomas et al. 2009, Bolognesi 2013) (Fig. 5e).

Cromatina Condensada (CC): estas células tienen núcleos intensamente teñidos, con regiones condensadas o cromatina agregada exhibiendo un patrón nuclear moteado o estriado, algunas veces aparecen como estructuras similares a los MN, pero estas no deben de ser contabilizados como MN ya que su origen aún no es determinado, tal vez están en etapas tempranas de la apoptosis (Tolbert et al. 1991, Thomas et al. 2009) (Fig. 5f).



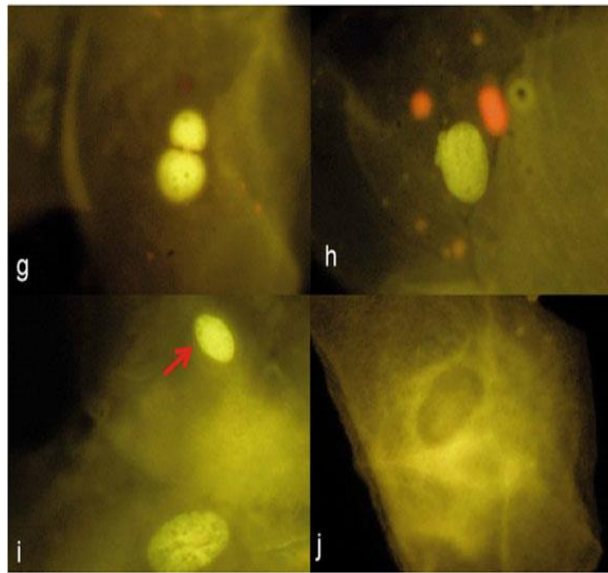
**Figura 5.** a. Células Normales, b. núcleo normal, c. Célula micronucleada (CMN); flecha micronúcleo (MN); d. Célula binucleada (BN), e. Cariorrexis (CR); f. Cromatina condensada (CC); Microscopio Binocular Mca. Carl Zeiss Mod Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL Filtro de 450 a 490 Nanómetros, Objetivo Planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam lcc 1, Imágenes capturadas a 400 y a 1000 aumentos reales (Fuente: Torres y Ramos 2013).

Brotos nucleares, broken eggs: el núcleo presenta una constricción en un extremo, su estructura es sugestiva aun proceso de gemación que involucra la eliminación o exceso de material nuclear por reparaciones de ADN no resueltas. El tamaño es de 1/3 a 1/16 del núcleo (Bolognesi et al. 2013). Tolbert y colaboradores (1991) los definieron como "Broken egg", y Bhattathiri et al. (1998) describe estos fenómenos como "Nuclear buds" reconociéndolas como anomalías nucleares (Tolbert et al. 1991, Thomas et al. 2009) (Furnus et al. 2014) (Shimizu et al. 1998). La diferencia es que estas prolongaciones están unidas al núcleo por un puente nucleoplasmático (Bolognesi et al. 2013). (Fig. 6g y 6h).

Núcleo picnótico (PN): estas células se caracterizan por tener un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear uniforme e intensamente teñido. El diámetro del núcleo es aproximadamente de 1/3 del núcleo normal y se piensa que estas células tal vez son una forma de muerte celular; sin embargo, el mecanismo preciso

sigue siendo desconocido. Hasta el momento, solo se correlaciona con diferenciación y maduración de las células epiteliales (Thomas et al. 2009, Bolognesi et al. 2013) (Fig. 6i).

Cariolisis (CL): estas células están completamente vacías de ADN y por lo tanto, no tienen núcleo. Es probable que representen una fase muy avanzada en el proceso de muerte celular. Sus núcleos están completamente agotados de ADN y por lo tanto aparece como una imagen fantasma (Bolognesi 2013) (Fig. 6j).



**Figura 6.** g-h. Núcleo lobulado típico (NL); Núcleo lobulado, i. Núcleo picnotico, flecha (PN); j. Cariolisis (CL). Microscopio Binocular Mca. Carl Zeiss Mod Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL Filtro de 450 a 490 Nanómetros, Objetivo Planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam lcc 1, Imágenes capturadas a 1000 aumentos reales (Fuente: Torres y Ramos 2013).



### 3. JUSTIFICACION

De las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo, cinco de ellas: la tortuga verde (*Chelonia mydas*), caguama (*Caretta caretta*), carey (*Eretmochelys imbricata*) laúd (*Dermochelys coriacea*) y kempii (*Lepidochelys kempii*) habitan y visitan cada año el litoral costero distribuyéndose por todo el Golfo de México y Caribe, principalmente alrededor de islas, zonas de arrecifes y costas rocosas. Desde Veracruz hasta Quintana Roo, se localiza la zona de anidación de tortugas marinas de mayor concentración en México, constituyendo quizás, las colonias reproductoras más grandes del mundo (Briseño 2016). Razón por la cual la conservación del hábitat es tan importante en esta área.

El estatus de conservación de las tortugas marinas de acuerdo con la Lista Roja de la Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN) denota que todas las especies de tortugas marinas se encuentran en Peligro de Extinción o en Peligro Crítico de Extinción (Seminoff 2004), por lo cual es mandatorio la aplicación de un método no letal para poder realizar estudios de monitorización de los efectos a la salud por la exposición a contaminantes (Camacho 2014). La cuantificación de micronúcleos ha sido considerada una herramienta práctica y no invasiva para la evaluación y seguimiento de efectos clastogénicos y aneugénicos causados por sustancias tóxicas que nos permitirán obtener resultados para la toma de decisiones en la conservación de esta especie y en las necesidades ambientales de nuestro ecosistema. (Furnus et al. 2014, Baesse 2015, Souto et al. 2018).

Gran parte de las sustancias encontradas en las aguas residuales de la industria y de la agricultura tienen un grado de toxicidad alto, son persistentes y resistentes a la biodegradación. De esta manera, pueden tener efectos negativos sobre diversos componentes ambientales y sobre la salud humana, bien sea en forma directa o indirecta. Entre estos contaminantes están los pesticidas, herbicidas organoclorados y fosforados, los metales pesados como el plomo, el cadmio y el níquel que son en su mayoría bioacumulables, genotóxicos, carcinogénicos y por lo tanto pueden prolongar su acción con consecuencias peligrosas (Baesse et al. 2011, Camacho et al. 2014). Aunado a esto la costa de la Península de Quintana Roo está en crecimiento urbano y turístico constante lo que afecta el hábitat y conlleva a la pérdida de especies y cambios rápidos y masivos en suelos.

Las tortugas marinas acumulan una variedad de compuestos químicos como resultado de su historia de vida y alimentación, ya que principalmente debido su posición en el nivel trófico, están sujetas a bioacumulación y biomagnificación de componentes tóxicos persistentes (Caurant et al. 1999, Keller 2013, Casini 2018). Se han reportado algunos efectos biológicos provocados por dicha exposición como estrés oxidativo celular, alteraciones reproductivas, desequilibrio hormonal, adelgazamiento de los cascarones de huevos y supresión del sistema inmune (Aguirre 1991, Swarthout et al. 2010, Komoroske et al. 2011, Labrada-Martagón et

al. 2011). La información que se tiene sobre los efectos toxicológicos en tortugas marinas causados por contaminantes derivados del crecimiento urbano es escasa, a pesar de ser una prioridad conocerlos para tomarlos en cuenta en los programas de conservación (Finlayson et al. 2016) ya que las tortugas marinas son una parte importante de la compleja trama trófica que contribuye a la salud del planeta en el que vivimos.

Por lo anteriormente mencionado la importancia de esta investigación en nuestro país El Salvador radica en la interconexión de los hábitat costero-marino que mantenemos con México, los cuales son importantes zonas de alimentación y anidación, no solo para la tortuga verde sino también para otras especies de tortugas marinas que se encuentran en peligro de extinción. (Moran y Dalto 2015).

#### **4. HIPÓTESIS**

Por medio de microscopia de fluorescencia será posible caracterizar y describir las anomalías nucleares de eritrocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) causadas por contaminantes presentes en el área que habitan.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Determinar la frecuencia y las características morfológicas de micronúcleos y anomalías nucleares en sangre periférica de tortuga verde (*C. mydas*).

##### **5.2 Objetivos específicos**

- ✓ Describir morfológicamente las anomalías nucleares de eritrocitos de tortuga verde por medio de microscopía de fluorescencia.
- ✓ Cuantificar la diferencia en la frecuencia de anomalías nucleares en sangre periférica de tortugas verdes capturadas en distintas zonas de alimentación y su relación con parámetros morfológicos como talla, edad y sexo.

- ✓ Estimar la circunferencia de los diferentes tipos de anomalías nucleares por medio de un índice de redondez

## **6. METODOLOGÍA**

Se detallan los métodos utilizados de captura por propósitos de la investigación, ya que las muestras con las que se trabajó en este estudio (34 muestras), todas fueron recolectadas y almacenadas en el laboratorio de Ecología de la Salud, de la Facultad de Ciencias, UASLP, previamente, para su posterior procesamiento y análisis.

Se realizó una estancia de capacitación en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, de septiembre 26 del año 2019 a noviembre 30 del mismo año, para el aprendizaje de las técnicas de laboratorio y de interpretación de imágenes para el procesamiento de las muestras previamente colectadas en el estado de Quintana Roo. (Anexo-1)

Las muestras pertenecen a tortugas capturadas en el área del Caribe Mexicano en el año 2019, con diferencia de edades, sexo, talla y estado de salud de 3 diferentes zonas de alimentación (Akumal, Xcalak y Punta Herrero).

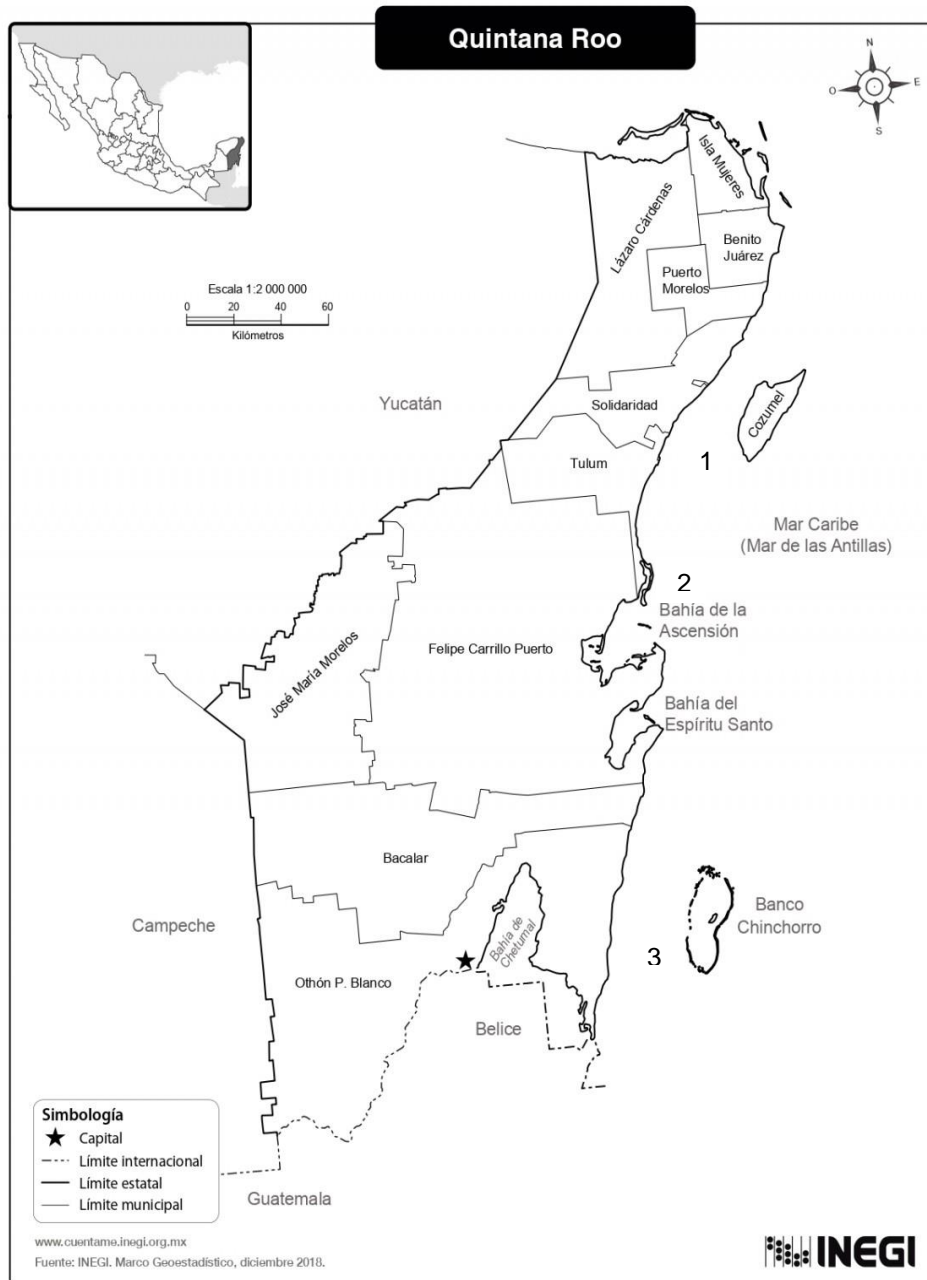
### **6.1 Tipo de estudio**

El tipo de estudio es ecológico, transversal, en donde se describe la variable de interés (frecuencia de anomalías) en un momento determinado del muestreo (2019) (Celis y Labrada, 2014). El trabajo de investigación también incluye un diseño descriptivo y de laboratorio donde se realizó una descripción morfológica de los micronúcleos en los eritrocitos de tortuga verde (*C. mydas*) mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia en las instalaciones del laboratorio de Ecología de la Salud, de la Facultad de Biología de la UASLP.

### **6.2 Zona de estudio**

La toma de muestras se llevó a cabo en el año 2019 por estudiantes del Laboratorio Ecología de la Salud, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. El muestreo fue llevado a cabo en el Caribe Mexicano en las zonas de la Bahía de Akumal, Xcalak y Punta Herrero las cuales se localizan en el estado

de Quintana Roo, el cual se ubica en la Península de Yucatán en el Sureste de la República Mexicana con las coordenadas geográficas 21° 35', al sur 17° 49' de latitud norte y 89° 25' de longitud oeste. Colinda al norte con Yucatán y con el Golfo de México, al este con el Mar Caribe, al sur con la Bahía de Chetumal, Belice y Guatemala y al oeste con Campeche y Yucatán (Figura 7).



**Figura 7.** Estado de Quintana Roo. (INEGI. 2018) Los números indican las zonas de estudio: 1. Akumal, 2. Punta Herrero 3. Xcalak.

### 6.3 Captura de los organismos

Se capturaron tortugas verdes (*C. mydas*) en tres bahías ubicadas en la costa de Quintana Roo (Fig. 7). En cada sitio el método de captura cambia debido a las condiciones ambientales, características de la bahía y el tamaño de los organismos.

#### Bahía de Akumal

La captura de los ejemplares en la Bahía de Akumal se realizó por medio de la técnica de captura en apnea y nado libre utilizando equipo de snorkel, capturando a aquellas tortugas marinas que se encontraban en el fondo descansando o comiendo (Labrada et al. 2019). Una vez capturada, la tortuga fue sujeta firmemente por la parte craneal (delantera) y caudal (trasera) del caparazón, colocada en posición vertical apoyada en el antebrazo, teniendo cuidado de mantenerla en la superficie para que pueda respirar mientras el bote se aproxima. Las tortugas verdes capturadas se subieron a la embarcación para su manejo y toma de datos (Muñoz-Tenería et al. 2017).

#### Bahías de Xcalak y Punta Herrero

En estas áreas se utilizó la técnica de avistamiento y persecución de ejemplares en bote, una vez que la tortuga se cansa y disminuye su velocidad una persona se arroja de la embarcación y realiza la captura con equipo de snorkel y aletas. La profundidad de la zona es menor a los tres metros, lo cual facilita este tipo de muestreo (Muñoz-Tenería et al. 2017, Rodríguez 2018).

### 6.4 Obtención de muestras biológicas

A cada tortuga marina capturada se le tomó una muestra de sangre inmediatamente después de su captura. La toma de muestras sanguíneas se debe realizar en un tiempo menor a 10 minutos y deben mantenerse en refrigeración por no más de 48 horas en hieleras a una temperatura aproximada de 4 – 8 °C hasta ser procesadas (Muñoz et al. 2016) las muestras se tomaron del seno venoso cervical siendo necesario en tortugas pequeñas extraer de 2-3 mL y a las tortugas grandes de 7 mL con aguja 21G x 1.5 in los cuales deben colocarse en tubos tipo vacutainer con heparina de litio como anticoagulante (Rodríguez 2018, Labrada et al. 2019). De cada individuo se midió el largo curvo (LCC) y el ancho curvo de caparazón (ACC) con cinta métrica flexible, también se verificó sexo, edad y estado de salud (FP

presente o ausente), para lo cual se realizó un examen físico en busca de fibropapilomas de acuerdo al protocolo estandarizado para fibropapilomatosis (Muñoz-Tenería et al. 2017). En el caso de las tortugas que presentaron tumores, se midieron y se realizaron biopsias para posteriores estudios. Finalmente los especímenes fueron marcados con etiquetas Monel (National Band and Tag Company, NBTC, Newport, Kentucky) en ambas aletas anteriores (Labrada Martagón et al. 2017) y fueron liberadas inmediatamente al terminar de registrar todos sus datos (Muñoz-Tenería et al. 2016).

Como no hay criterios visuales externos que nos permitan clasificar a los especímenes juveniles (dimorfismo sexual) (Labrada et al 2014), estos fueron clasificados como adultos de acuerdo con el tamaño mínimo de anidación (86 cm LCC) reportado de hembras de Quintana Roo (Zurita 2015). Se clasificaron como machos adultos cuando presentaban caracteres secundarios (presencia de uñas y desarrollo de cola más larga que se prolonga más allá del caparazón) y los que midieron <86 cm LCC y no presentaban caracteres secundarios se catalogaron como tortugas marinas de sexo indeterminado (Labrada et al 2017).

## **6.5 Análisis de laboratorio**

El procesamiento de las muestras para tinción y toma de fotografías con el microscopio de fluorescencia se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Se trabajó un tipo de tinción de las laminillas para el conteo de anormalidades nucleares por microscopia de fluorescencia. Esta fue la tinción de naranja de acridina que es un colorante catiónico y metacromático, que emite fluorescencia cuando interactúa con los ácidos nucleicos. Con el ADN se intercala produciendo una coloración verde fluorescente y con el ARN interactúa expresando una tonalidad rojo fluorescente (Flores et al. 2014).

### **6.5.1 Conteo de anormalidades nucleares**

Con las muestras sanguíneas colectadas se prepararon frotis sanguíneos por duplicado los cuales fueron teñidos de acuerdo al protocolo específico para tortugas marinas descrito por Labrada y colaboradores (2019). Las laminillas fueron secadas al aire y fijadas por 5 minutos en etanol preparado al 80%, se utilizó naranja de acridina a una concentración de 0.01 g 100 mL<sup>-1</sup> en un búfer de fosfato (PH 7.4) para teñir las muestras durante 5 minutos. Posteriormente, se lavó en el mismo

búfer de fosfatos por 5 minutos y se pusieron a secar en estufa a 45°C en oscuridad. Una vez secas las laminillas fueron almacenadas en oscuridad y fueron observadas en un microscopio de fluorescencia antes de cumplir cinco días de haber sido teñidas (Labrada- Martagón et al. 2019). (Anexo-2) (Anexo-3)

Previamente a la observación y una vez fijadas y teñidas las muestras se colocó una gota de buffer de fosfatos (pH 7.4) y luego un cubreobjetos. Para su visualización se utilizó un microscopio óptico vertical de fluorescencia modelo IMAGER M2, marca Zeiss, utilizando el filtro Filter set 38 para la observación y conteo de las anomalías nucleares (Labrada et al. 2019). Se tomaron 20 fotografías digitales por individuo (laminillas sanguíneas por duplicado), con el objetivo 40x y con una cámara integrada al microscopio modelo AxioCAM MRc, marca Zeiss, por medio del software Zen Pro 2012 Blue Edition (Carl Zeiss 2011). Las fotografías fueron tomadas asegurándose de fotografiar los diferentes campos de la laminilla siguiendo un patrón en forma de zig-zag. Los hallazgos fueron fotografiados con objetivo 100x. (Anexo-4)

El conteo y estimación de la frecuencia de MN y prolongaciones nucleares (buds) se realizó contando 2000 eritrocitos por tortuga marina (20 fotografías) (Gómez-Meda et al. 2006; Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al. 2019). El conteo de células con anomalías nucleares se realizó en las fotografías, documentando el número de MN y buds en un total de 2000 eritrocitos. (Anexo-5)

Para la diferenciación de MN y BN se utilizaron los criterios de clasificación e identificación establecidos por Thomas (2009) y Bolognesi (2013) que especifican que en el caso de las células micronucleadas estas presentan uno o más MN de un tamaño de 1/3 a 1/16 del núcleo principal, tienen la misma textura, color e intensidad de tinción y están claramente separados del núcleo. En el caso de las prolongaciones o brotes nucleares siempre presentan la misma textura y color que el núcleo y pueden tener las mismas dimensiones que los micronúcleos, pero hay ocasiones en las que pueden ser más grandes que el núcleo principal, la diferencia es que estas prolongaciones están unidas al núcleo por un puente núcleo-plasmático (Bolognesi et al. 2013).

## **6.6 Morfología de membrana celular en anomalías nucleares**

Se realizó la medición de los núcleos de los eritrocitos de 15 diferentes fotografías tomadas al azar, utilizando las fotografías obtenidas de las muestras teñidas previamente con naranja de acridina de tortugas marinas de Xcalak y Akumal. La medición se realizó utilizando el software de procesamiento digital programado en Java *ImageJ* desarrollado por National Institutes of Health por medio del cual se

obtuvieron los estadísticos a partir de la fotografía. Se usó el archivo de imagen de los eritrocitos, se ajustó la escala y se usó la herramienta de selección poligonal con la cual se fue midiendo el borde de la circunferencia de cada uno de los núcleos para posteriormente realizar la captura de los datos y clasificar los núcleos de acuerdo a su forma.

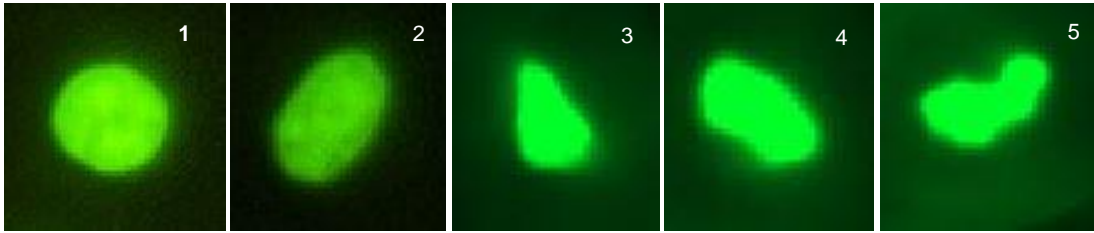
A partir del análisis de imagen se arrojaron como resultado 8 diferentes mediciones de las cuales una fue la que se consideró en este estudio para su análisis. El índice de redondez del núcleo se utilizó para evaluar el cambio en la redondez del núcleo a través de las diferentes anomalías clasificadas a priori. Por medio de la ecuación (1) se estimó el índice de redondez del núcleo. El rango del valor de la circunferencia es de 0 a 1, mientras más se acerque a 1 más cercana es la forma del núcleo a un círculo.

$$redondez = 4 \times \frac{\text{área}}{\pi \times \text{eje mayor}^2} \quad [1]$$

Por motivos de evaluación de la eficacia del índice de redondez propuesto se realizó una clasificación *a priori* de los núcleos de toda la fotografías ( $n=15$ ) usando como criterio la forma del núcleo. Nuestro criterio de clasificación consiste en 5 diferentes formas: Circular (C) para aquellos núcleos con una forma muy cercana a un círculo uniforme, elongado (E) para aquellos con una forma ovalada uniforme, cónico (K) para aquellos con una apariencia triangular o cónica, curvatura invertida (CI) para aquellos que presentaran una especie de cavidad o curvatura y forma indeterminada (I) para aquellos cuya forma no se ajustara a ninguno de los criterios anteriores. Se descartaron aquellas células de la periferia, incompletas o con baja definición del MN.

Se creó una base de datos a partir de la cual se obtuvieron por zona, por fotografía, las proporciones de las mediciones obtenidas del núcleo para cada una de las formas del núcleo observadas en cada muestra (Fig. 8).





**Figura 8.** Clasificación del tipo de núcleos. Fotomicrografías de los cinco tipos de núcleos de eritrocitos considerados en este estudio: 1) circular (C), 2) elongada (E), 3) cónica (K), 4) curvatura invertida (CI), 5) indeterminada (I).

## 7. ANALISIS ESTADISTICOS

En los métodos estadísticos se tomaron en cuenta únicamente aquellas muestras donde el conteo de eritrocitos alcanzó un total de al menos 2000 eritrocitos por individuo. Se evaluaron los supuestos estadísticos de normalidad y homogeneidad de varianza por medio de las pruebas Kolmogorov Smirnov y prueba de Barlett, respectivamente (Zar 1996). Debido a que las variables de frecuencia de datos no cumplieron el supuesto de normalidad, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas conforme los resultados obtenidos en dichas variables.

Se estimó la frecuencia relativa de tortugas verdes con presencia de anomalías nucleares para las tres zonas de estudio (Akumal, Xcalak y Punta Herrero) y se evaluó si había diferencias significativas en la frecuencia de anomalías nucleares entre zonas de alimentación por medio de la prueba de Kruskal Wallis. Asimismo, se evaluó si existe una correlación entre la talla de los individuos y el número de anomalías nucleares encontradas en sangre periférica (Zar 1996).

Se utilizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA) para evaluar diferencias en el índice de redondez entre todos los tipos celulares definidos a priori (eritrocitos circulares, elongados, cónicos, con curvatura invertida y con forma indeterminada) y considerando el factor del sitio de estudio. En un diseño de medidas repetidas se evalúa el efecto de un factor sobre una variable independiente medida en dos o más ocasiones para un mismo individuo o para varios individuos que pertenecen a un mismo grupo. Las ventajas de los diseños de medidas repetidas requieren menos sujetos que un diseño completamente aleatorizado y permiten eliminar la variación residual debida a las diferencias entre sujetos (Muñoz 2019).

El nivel de significancia que se consideró en todos los estadísticos realizados fue de  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron en Statistica v.7 (StatSoft 2004) y Past versión 4.03 (Muñoz 2019).

## 8. RESULTADOS

El total de tortugas verdes que se capturaron en el año 2019 para esta investigación fueron 34 individuos. De las cuales 13 se capturaron en Xcalak, 7 en Bahía de Akumal y 14 en Punta Herrero. Del total de tortugas capturadas ( $n=34$ ) el 14.7% ( $n=5$ ) de los especímenes presentó evidencia de fibropapilomas. Las tortugas que presentaron fibropapilomatosis se capturaron en Xcalak ( $n=1$ ) y Akumal ( $n=4$ ).

### 8.1 Estructura poblacional

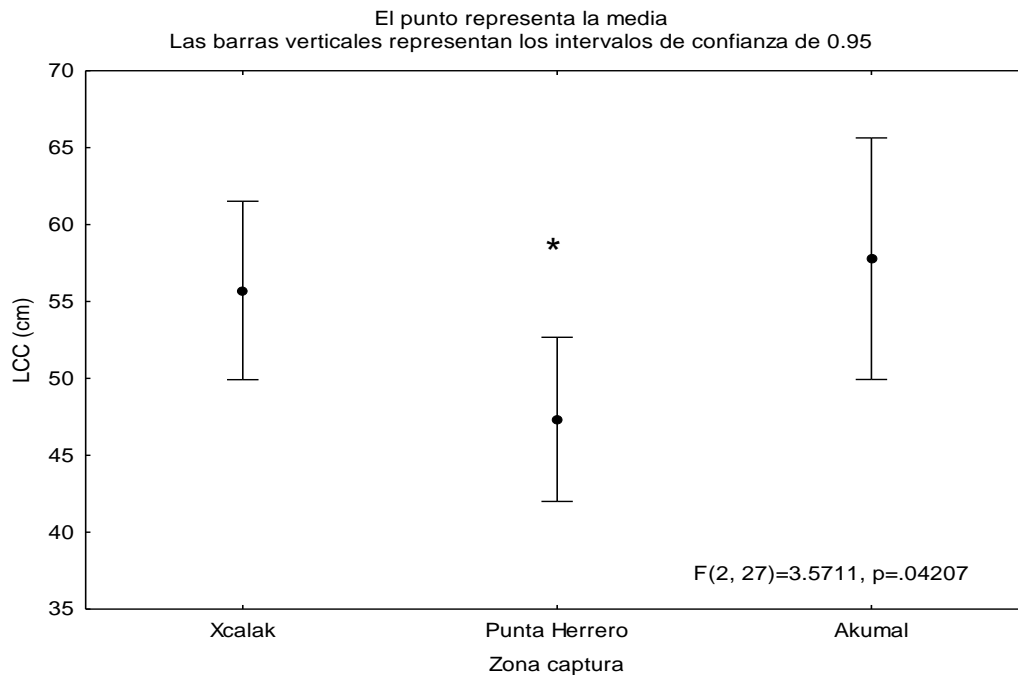
La talla promedio de las tortugas verdes agrupadas por zona de captura se presenta en la tabla 1. Las tortugas que presentaron mayor tamaño corporal fueron las que habitan en el área de la Bahía de Akumal (rango 47-71 cm LCC), seguidas por los especímenes de Xcalak (rango 33-66 cm LCC) siendo ambas zonas las que albergan a los individuos de mayor tamaño de nuestro estudio, por último en el área de Punta Herrero se encontraron a especímenes con el menor tamaño (rango 31-57 cm LCC). Con la talla se infiere que solamente se trabajó con tortugas verdes juveniles inmaduros y de sexo indeterminado.

Se encontraron diferencias significativas ( $p=0.04$ ) en la talla de los individuos, las tortugas de Punta Herrero presentaron un menor tamaño ( $p=0.03$ ) significativamente diferente a los tamaños encontrados en Xcalak y Akumal (Fig. 9).

**Tabla 1.** Largo curvo de caparazón (LCC) de la tortuga blanca (*C. mydas*) por zonas de estudio.

	n	Mean	Median	Std.Dev.	Rango	P10	P90	p
Xcalak	11	55.71	56.50	9.934	33.5-66.20	47.2000	66.1000	0.04
Punta Herrero	13	47.33	47.40	9.013	31.1-57.9	31.7000	57.9000	
Akumal	6	57.78	57.55	9.070	47.2-71.8	47.2000	71.8000	

Abreviaturas: Std.Dev., desviación estándar; P10, percentil 10%; P90, percentil 90%, p, significancia estadística de la prueba ANOVA.



**Figura 9.** Largo curvo del caparazón (LCC) de la tortuga verde (*C. mydas*) por zonas de estudio. Xcalak, Punta Herrero y Bahía de Akumal. \*Denota la diferencia significativa.

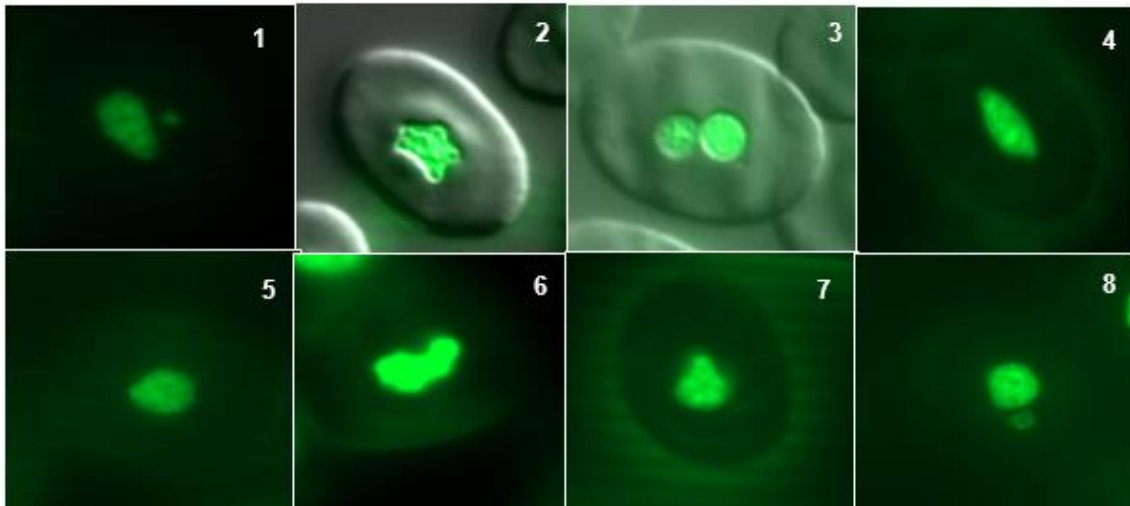
## 8.2 Anormalidades nucleares

Utilizando el protocolo de tinción específico para tortuga marina (Labrada-Martagón et al. 2019) se lograron identificar cuatro distintas anomalías nucleares diferentes de las ya antes descritas (Fig. 10) que se describen a continuación:

- i. **Núcleo ampollado (bebbled):** es cuando el núcleo presenta una pequeña evaginación o pequeñas proyecciones que pueden contener eurocromatina más oscura de lo normal y su tamaño fluctúa desde una pequeña protrusión hasta una estructura totalmente circunscrita, estas se consideran precursores de MN (Carrasco et al. 1990; Shimizu et al. 1998).

- ii. **Núcleo lobulado (lobed):** es un núcleo con evaginaciones más largas que un núcleo con ampolla, también se diferencia en que pueden presentar varias prolongaciones (Carrasco et al. 1990).
- iii. **Núcleo muescado (notched):** un "notch" se define como un corte que genera una muesca en el núcleo no teniendo un tamaño definido pero casi siempre siendo similar a una vacuola. (Carrasco et al.1990).
- iv. **Núcleo en forma de ocho (eightshape):** es simplemente cuando el núcleo presentan una constricción que adquiere una forma de ocho. (Furnus 2014).

La frecuencia de MN y anomalías nucleares de las tortugas verdes agrupadas por zona de estudio se presentan en la tabla 2. Al realizar los conteos se encontraron 4 muestras (2 de Xcalak, 1 de Punta Herrero y 1 de Akumal) en las que no se llegaron a contar 2000 eritrocitos, por lo cual no se tomaron en cuenta en los resultados ni para realizar las pruebas estadísticas.



**Figura 10.** Anormalidades identificadas en sangre periférica de tortuga verde (*C. mydas*) de la costa de Quintana Roo. 1) Micronúcleo (40x); 2) núcleo lobulado (40x); 3) célula binucleada (100x); 4) núcleo ampollado (40x); 5) Brote nuclear (40x); 6) núcleo con muesca (40x); 7) núcleo en forma de ocho (40x); 8) micronúcleo (100x).

**Tabla 2.** Frecuencia de Micronúcleos (MN), buds y anomalías nucleares (AN) en sangre periférica de tortuga blanca (*C. mydas*) en 3 zonas de estudio en Quintana Roo.

Zona	Variable	n	Mean	Median	Std.Dev.	Rango	P10-P90	H	p
Xcalak	N° MN	11	2.63	1	4.696	0-13	0-11		
	N° BUDS	11	56.27	40	41.257	0-132	20-113	MN=2.98	0.22
	N° anormal	11	43.54	22	63.363	0-219	07-91		
Punta Herrero	N° MN	13	1.69	0	4.110	0-15	0-3		
	N° BUDS	13	41	29	30.339	16-127	18-68	BUD=2.66	0.26
	N° anormal	13	37.46	12	79.530	1-297	5-60		
Akumal	N° MN	6	2.83	1.5	3.371	0-8	0-8	AN= 3.13	0.21
	N° BUDS	6	24.66	33	18.326	0-41	0-41		
	N° anormal	6	30.33	8.5	54.503	0-140	0-140		

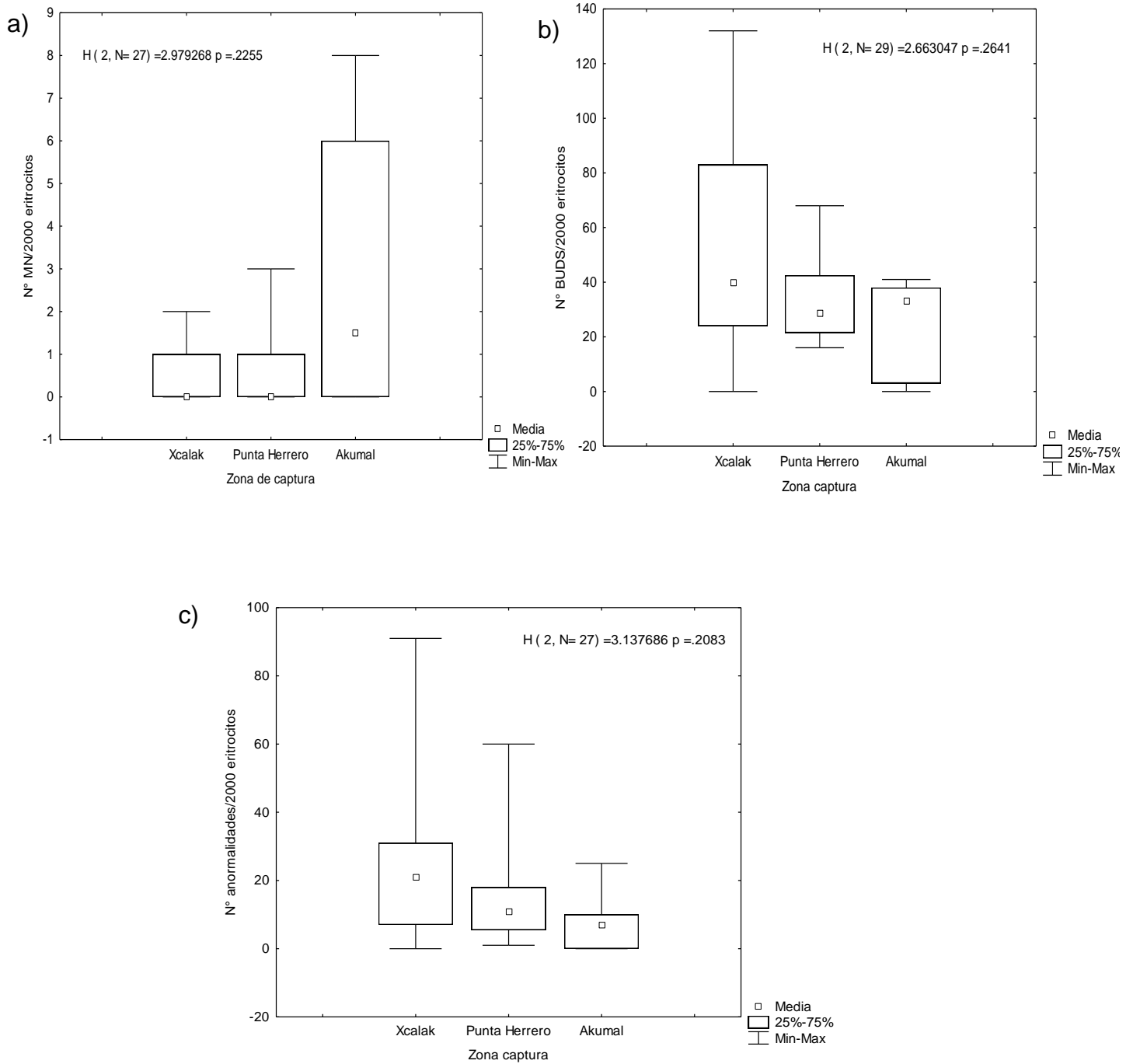
Abreviaturas: Las anomalías se expresan en 2000 eritrocitos; P10-90: percentil 10% y percentil 90%; H: resultados de Kruskal-Wallis para la comparación entre zonas.

No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de MN ( $H=2.98$ ,  $p=0.22$ ), buds ( $H=2.66$ ,  $p=0.26$ ) y anomalías nucleares ( $H=3.13$ ,  $p=0.20$ ) entre las zonas de estudio (Fig. 11). Sin embargo, si se observa una tendencia diferencial entre zonas en la frecuencia de organismos con anomalías nucleares siendo Akumal la bahía con mayor número de afectaciones. Por ejemplo, en la Bahía de Akumal se encontró que el 50% de las tortugas blancas capturadas presentaron un valor  $\leq 1.5$  MN 2000 eritrocitos<sup>-1</sup>, mientras que en la zona de Xcalak se detectó que el mismo porcentaje de animales afectados presentaron un valor  $\leq 1$  MN 2000 eritrocitos<sup>-1</sup> y el 50% de los individuos capturados en Punta Herrero no presentaron MN.

Con respecto a otros tipos de anomalías, el 10% de la población no presentó buds ni MN en Bahía de Akumal pero el 90% de la muestra presentó  $\leq 140$  anomalías por cada 2000 eritrocitos<sup>-1</sup> mientras que el 90% de la muestra de Xcalak presentó  $\leq 91$  anomalías 2000<sup>-1</sup> eritrocitos de diferentes tipos y en Punta Herrero  $\leq 60$  anomalías 2000 eritrocitos<sup>-1</sup>.

Las tortugas marinas de Xcalak, presentaron una mayor frecuencia de buds en el 50% de las muestras (56 buds 2000 eritrocitos<sup>-1</sup>) en comparación con Punta Herrero (41 buds 2000 eritrocitos<sup>-1</sup>) y Akumal (24 buds 2000 eritrocitos<sup>-1</sup>).

No se encontró una correlación entre las tallas de las tortugas blancas y la frecuencia de los diferentes tipos de anormalidades en eritrocitos cuando se analizaron a las tortugas marinas de todas las zonas (MN  $r=0.07$ , buds  $r=0.06$ , anormalidades  $r=0.08$ ).



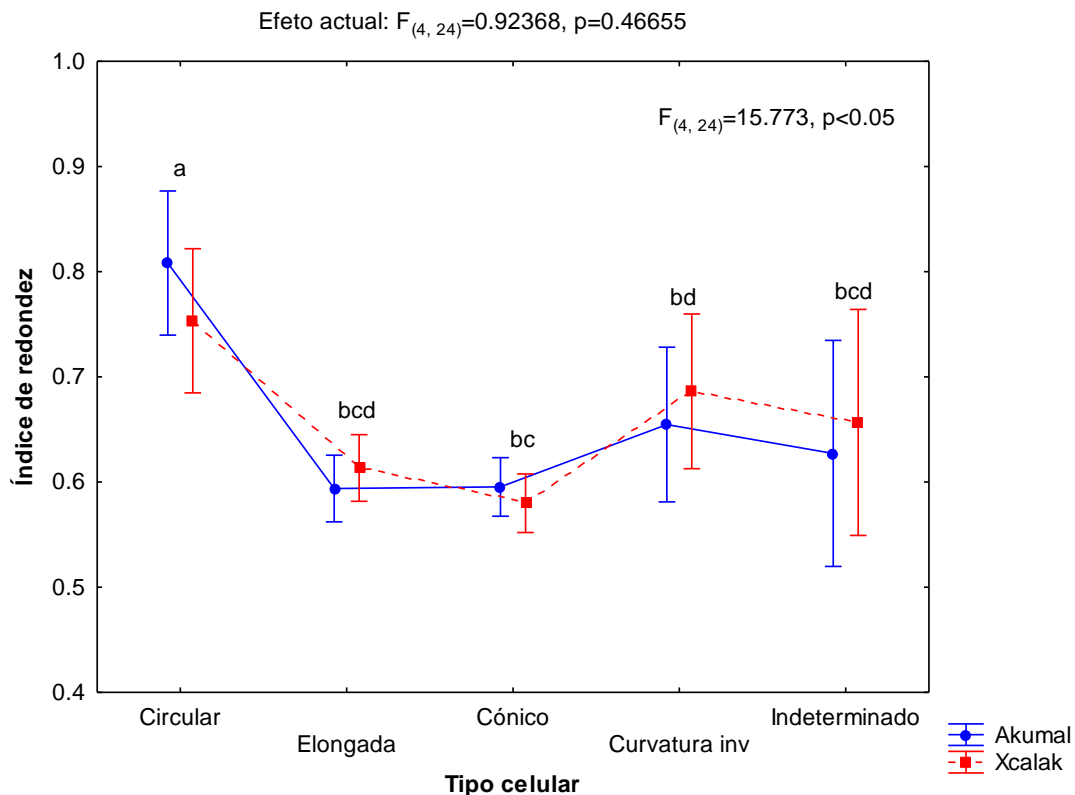
**Figura 11.** Frecuencia de a) MN, b) buds y c) anomalías presentes en 2000 eritrocitos de tortuga verde (*C. mydas*) por zona de estudio.



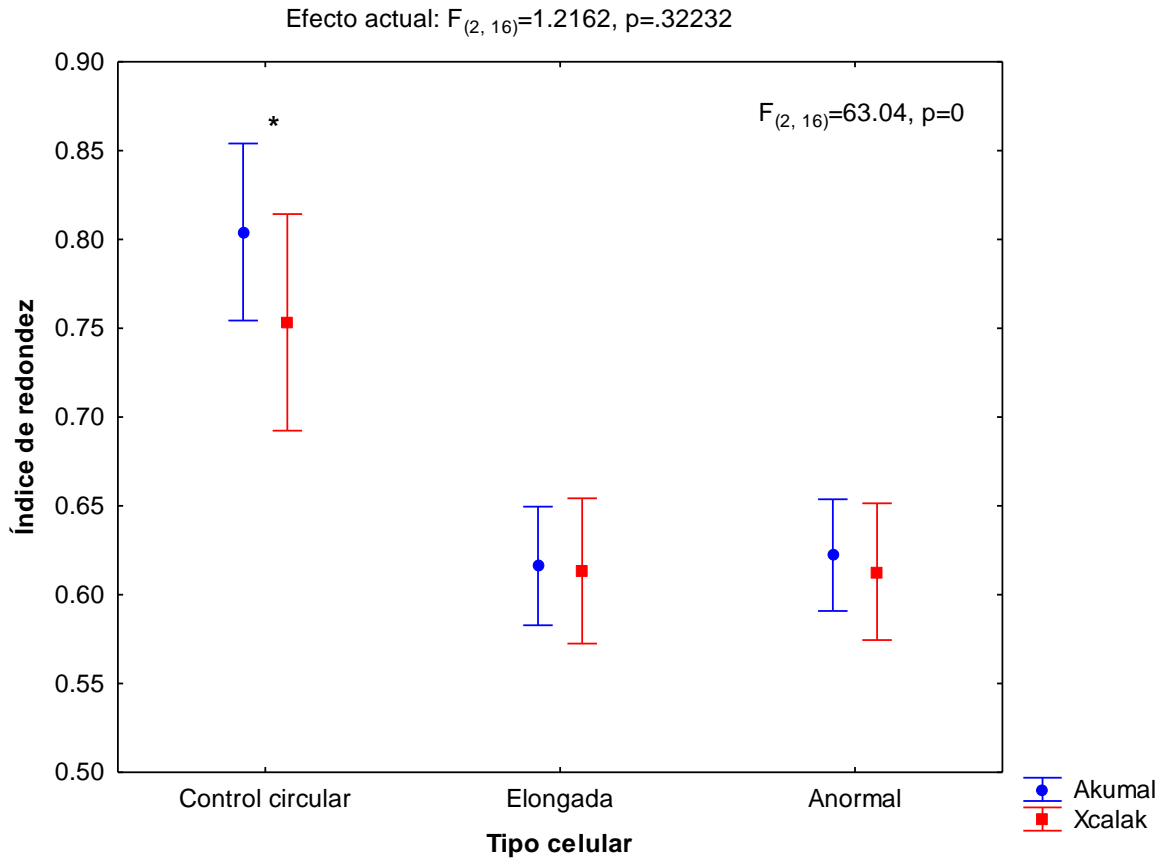
### 8.3 Morfología de anomalías nucleares

Al comparar el índice de redondez entre todos los tipos celulares definidos a priori (eritrocitos circulares, elongados, cónicos, con curvatura invertida y con forma indeterminada) se logra determinar que los eritrocitos circulares inmaduros presentan los mayores valores promedio al resto de los tipos celulares ( $F_{(4,24)}=15.75$ ;  $p<0.0012$ ) (Fig. 12). Las células circulares son significativamente más redondas que las elongadas, cónicas, indeterminadas ( $p=0.0001$ ) y con curvatura invertida ( $p=0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas en el índice de redondez entre ninguna de las células anormales (cónicas, curvatura invertida e indeterminadas) ni entre éstas con las células elongadas (Fig. 12).

Cuando se compara el índice de redondez únicamente entre células circulares, elongadas y anormales, se encuentran diferencias significativas en los eritrocitos circulares celulares ( $F_{(2,16)}=63.04$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 13). No se encuentran diferencias estadísticas significativas en el grado de redondez entre los eritrocitos sanos (elongados) y los anormales (Fig. 13).



**Figura 12.** Índice de redondez en eritrocitos de tortuga verde (*C. mydas*) de dos zonas de estudio en Quintana Roo. Las letras distintas denotan los tipos celulares significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) según Tukey. Las barras verticales representan el 95% de confianza.



**Figura 13.** Índice de redondez en eritrocitos de tortuga verde (*C. mydas*) de dos zonas de estudio en Quintana Roo. ( $p<0.05$ ). El asterisco representa diferencia significativa entre células circulares con anormales y elongadas según Tukey.

## 9. DISCUSION

### 9.1 Estructura poblacional

En marzo de 2016, la bahía de Akumal fue declarada “Refugio Marino de especies protegidas” por las autoridades federales Mexicanas. (DOF, 2016a); Punta Herrero pertenece a la Reserva de la Biósfera de Sian Ka’an, designada Reserva en 1986 (Periódico Oficial, 2002) y Xcalak en el 2000 se le reconoció por decreto como Área Natural Protegida (DOF, 2003), estas áreas son ricas en variedades de corales, manglares y pastos marinos lo que la hace ideal para el crecimiento y alimentación de esta especie de tortuga marina.

En el presente estudio todos los especímenes capturados resultaron ser individuos inmaduros de sexo desconocido, ya que no presentaron caracteres secundarios y no tenían medidas suficientes para catalogarlos como adultos. Uno de los criterios de clasificación de tortugas verdes adultas es la talla mínima de anidación de hembras anidadoras de tortuga verde (*C. mydas*), la cual es de 86 cm LCC (Zurita 1993). Se determinaron diferencias significativas en la talla de las tortugas capturadas entre zonas de captura. La mayor diferencia la presentó la Bahía de Punta Herrero que ya que en esta zona se encontraron a los especímenes más pequeños. Estos resultados coinciden con la literatura ya que estas zonas son catalogadas como zonas de alimentación y crecimiento de juveniles inmaduros de tortuga verde (Labrada-Martagón et al- 2017) y los adultos prefieren zonas costeras y sitios más profundos en la costa de Quintana Roo (datos sin publicar) así como en otras poblaciones de la misma especie (López-Mendilaharsu et al. 2002).

### 9.2 Prevalencia de fibropapilomatosis

El total de tortugas verdes capturadas con evidencia de fibropapilomatosis (14.7%) de este estudio no es suficiente para poder evaluar genotoxicidad debido al tamaño de muestra y a que, si esta enfermedad está en una fase incipiente, no encontraríamos evidencia del daño genético que queremos comprobar con nuestros análisis. Sin embargo, en estudios previos se ha reportado que en las Bahías de Akumal y Punta Arenas las poblaciones de tortuga verde han presentado un incremento en la prevalencia de la enfermedad de un 39% a un 41% de individuos afectados solamente del 2015 al 2016, lo que se asocia al incremento de actividades turísticas en estas zonas (Rodríguez 2018), siendo principalmente los individuos inmaduros los más afectados (Jones et al. 2016). Igualmente se ha demostrado en la costa de Quintana Roo un incremento de fibropapilomatosis a través de los años

desde el 2015 con una prevalencia del 18% de individuos afectados y ha ido aumentando así en el 2016 un 27% hasta un 54% en el 2018 (Islas 2020). Siendo un tema de importante preocupación en estas áreas de México dada la severidad y riesgos asociados por esta enfermedad emergente para las tortugas marinas.

### 9.3 Anormalidades nucleares

Utilizando el protocolo de tinción estandarizado para la especie de este estudio, establecido por Labrada y colaboradores (2019) fue posible identificar en cada laminilla no solo los MN y buds, sino también otras anomalías nucleares que fueron clasificadas de acuerdo a los estudios de daño genético realizado en peces y mamíferos diversos (Carrasco et al. 1990, Bolognesi et al. 2013, Furnus 2014). Diversos autores estipulan que todo cambio en la morfología nuclear puede ser indicativo de genotoxicidad (exceptuando daños que determinan muerte celular) (Shimizu et al. 1998; Kirsch et al. 2011; Torres y Ramos 2013).

Estudios previos como el de Gómez-Meda (2006) y colaboradores evaluó una relación positiva al hacer uso de inyecciones intracelómicas de mitomicina-C (droga citostática) en aves (*Aratinga canicularis*) comprobando resultados positivos en la frecuencia de MN y buds causados por sustancias externas. Diferentes deformidades nucleares también han sido encontradas en peces como (*Gambusia affinis*) que son afectadas por pesticidas utilizados en agricultura, estas anomalías nucleares encontradas como núcleos lobulados, núcleos ampollados y núcleos muescados también son evidencia de genotoxicidad (Carrasco et al. 1990; Cavas y Ergene 2005; Gokalp et al. 2011). Estos resultados son asociados a que el ambiente marino es el destino final de muchos contaminantes y se ha comprobado que el uso de pesticidas en el área de agricultura llega hasta los reservorios de agua, corrientes y ríos causando impacto directo en la biota incluyendo fauna animal que habita en ella (Gokalp et al. 2011)

El ensayo de MN es, por tanto, un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, además reduce la dificultad de recuento, mejora la sensibilidad del ensayo e incrementa la potencia estadística de los estudios al analizar miles de células, reduce los costos de ensayo y se adapta fácilmente a diferentes especies (Gómez-Meda et al. 2006; Kirsch et al. 2011).

La prueba de MN se ha realizado en diversas especies como el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), Zamora y colaboradores (2006) demostraron la utilidad de esta especie para estudios en toxicología en mamíferos acuáticos ya que a diferencia de otras especies de delfines, el delfín nariz de botella presenta eritrocitos

policromáticos en sangre periférica lo cual permite aplicar el estudio de MN a largo plazo y obtener mejores resultados.

La prueba de MN es una técnica que permite detectar las aberraciones cromosómicas tanto estructuralmente como de forma numérica que son inducidas por componentes clastogénicos o aneugénicos y su facilidad se debe a que es fácil, rápido y económico y en especies silvestres no es necesario el sacrificio del espécimen para obtener muestras (Zuñiga et al. 1996; Zamora et al. 2006). Diversos autores han comprobado daño genotóxico y utilizan esta misma técnica para monitoreo de salud en humanos (Fenech et al. 2011; Kirsch et al. 2011). La exposición crónica a bajas concentraciones de varios químicos son asociados a desordenes fisiológicos que conducen a diversas patologías incluyendo cáncer y esta técnica, permite incluso predecir un diagnóstico temprano de estas (Nikolouzakis et al. 2018).

Da Silva y colaboradores (2016) realizaron la prueba de MN para evaluar daño en las tortugas blancas en vida libre en Brasil con un tamaño de muestra de ( $n=27$ ) y con un 51.9% de su población afectada por fibropapilomas, en el cual reportan un incremento en la formación de aberraciones cromosómicas (MN) en las tortugas de mayor tamaño. Sin embargo en los resultados estadísticos de este estudio no hubo correlación entre la talla (LCC) y la frecuencia de MN y demás anomalías con un tamaño de muestra ligeramente mayor ( $n=34$ ). Lo anterior podría estar relacionado con el número de especímenes sanos de este estudio, solamente un 14% de los individuos presentaron FP y los demás estaban sanos o estaban en alguna fase incipiente de la enfermedad. Además, todos los especímenes en el presente estudio fueron juveniles, con dieta predominantemente herbívora (Molina, y Tussenbroek, 2014), que habitan en bahías donde predominan las especies de pastos marinos *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* (Tussenbroek et al. 2014), lo cual pudiera contribuir a no observar resultados significativos reportados en Brasil.

En los resultados de los análisis de comparaciones por zonas de captura fue posible demostrar que no hubo diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de MN y anomalías, sin embargo si se observa mayor variabilidad en los resultados en la Bahía de Akumal ya que tanto la media y la mediana presentan valores más altos en los especímenes de esta área en comparación con Xcalak y Punta Herrero. En la Bahía de Akumal se presentó un máximo de 8 MN  $2000^{-1}$  eritrocitos y el 75% de las tortugas marinas muestreadas presentaron 6 MN  $2000^{-1}$  eritrocitos. Por el contrario en la zona de Xcalak se detectó un valor máximo de 13 MN  $2000^{-1}$  eritrocitos y el 75% de su población solamente presentó 1 MN  $2000^{-1}$  eritrocitos de los cuales el 25% no tuvo micronúcleos. Por último Punta Herrero presentó un número máximo de 15 MN  $2000^{-1}$  eritrocitos, sin embargo el 75% de la población

solamente presento 1 MN 2000<sup>-1</sup> eritrocitos y el 25 % ninguno, considerando así el número máximo como un dato extremo. Con estos resultados podemos inferir que Akumal sigue siendo la zona más afectada y los valores han ido en aumento ya que estudios previos de Labrada y colaboradores (2019) presentaron resultados en los cuales se evaluaron MN y buds en Akumal y Punta Herrero en tortugas capturadas durante el año 2015 para la estandarización de la técnica y no se encontraron diferencias significativas pero, en Akumal, un 68% de las tortugas verdes ( $n=15$ ) presentaron anomalías nucleares y un 25% ( $n=5$ ) presentaron más de 6 buds, así también Rodríguez (2018) en tortugas capturadas durante el año 2016 detectó un 94.3% de especímenes afectados con MN evidenciando un incremento alarmante. En nuestra investigación se ha podido verificar el daño continuo en ambas zonas ya que en Akumal el 83% ( $n=5$ ) de las tortugas verdes capturadas presento buds reflejando un incremento muy grande en este tipo de anomalías y el 67% de los especímenes ( $n=4$ ) presento otro tipo de anomalías nucleares. A pesar de que en este estudio el tamaño de muestra fue menor al empleado en los años 2015 y 2016, este porcentaje de tortugas marinas con anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica se mantiene. Por lo cual se confirma que los especímenes de las mismas zonas estudiadas desde el 2015, siguen siendo afectados por la contaminación persistente de estas áreas turísticas ya que nuestros especímenes del 2019 incrementaron el número de células afectadas.

El resultado anterior no sorprende, siendo la Bahía de Akumal una de las zonas que más ha experimentado un acelerado desarrollo turístico en los últimos 10 años (Barrera-Escorcia y Namihira-Santillán 2004; Slater 2014; SEMARNAT 2016b) y que por ende ha desencadenado una serie de factores estresantes para las tortugas marinas como resultado de las mismas actividades que ahí se realizan. Actividades recreativas como el avistamiento de anidación, alimentación de los especímenes, nado con tortugas marinas con guías turísticos en zonas poco profundas, etc. han llevado a una interrupción del ecosistema natural de las tortugas. Las actividades turísticas y la presencia de nadadores en las bahías generan contaminación marina, por uso de bloqueadores, incidencia de aguas residuales de construcciones aledañas, basura, etcétera, además de que invaden el espacio marino e interrumpen las anidaciones (SEMARNAT 2007, CONANP 2016).

Desde el año 2003, el turismo de la Riviera Maya comenzó a incrementar significativamente (Ruiz 2008), demostrándose que en la temporada turística la contaminación por coliformes fecales aumentaba y que las zonas aledañas a la Bahía de Akumal no daban tratamiento tampoco a sus aguas negras (Barrera-Escorcia y Namihira-Santillán 2004). Se ha reportado un incremento en los niveles de isotopos de nitrógeno que también están asociados al mayor nivel de aguas residuales y que afectan las especies de corales de la Bahía (Baker et al. 2010). Por lo anterior, los resultados obtenidos de daño a la membrana nuclear y presencia

de micronúcleos en la tortuga verde que habita en Bahía de Akumal, sugieren una afectación genotóxica en ese sitio de alimentación y hábitat de las tortugas marinas. A pesar del comportamiento migratorio de la tortuga verde se ha comprobado que en la Bahía de Akumal las tortugas verdes pueden ser residentes del sitio por un periodo de hasta 10 años, ya que estas permanecen en la misma área de alimentación hasta que llegan a la madurez (Labrada-Martagón et al. 2017) lo anterior confirma que el daño genotóxico observado en los individuos de Akumal es un biomarcador que determina el daño generado por exposición en la Bahía.

La presencia de buds, o brotes nucleares son proyecciones nucleares bien definidas y que representan un estadio diferente o predecesor de los MN (Carrasco et al.1990; Shimizu et al. 1998, Fenech et al. 2002). Los resultados obtenidos, aunque no fueron estadísticamente significativos demuestran que hay una mayor variabilidad en la frecuencia de este tipo de anormalidades en la zona sur, específicamente en el área de Xcalak (Figura 11). En la zona de Xcalak se presentó un rango 0-13, aunque el 75% de la población presentó un valor menor de 80 buds  $2000^{-1}$  eritrocitos por individuo y el 25% de los individuos presentaban un valor de 20 buds/2000 eritrocitos, por lo cual se determinó que el valor máximo observado (132 buds  $2000^{-1}$  eritrocitos) fue un dato extremo. De igual forma en Punta Herrero el número máximo de buds encontrados fue de 127 buds  $2000^{-1}$  eritrocitos, aunque el 75% de los especímenes muestreados presentaron menos de 40 buds  $2000^{-1}$  eritrocitos.

La frecuencia de anormalidades nucleares también presentó mayor variabilidad en Xcalak y Punta Herrero en comparación con Akumal, presentando el 50% de su población 22 y 12 anormalidades  $2000^{-1}$  eritrocitos mientras que en Akumal fue de 8.5 anormalidades  $2000^{-1}$  eritrocitos.

Estos resultados coinciden con lo reportado sobre la concentración de metales pesados en agua, cuantificados en muestras colectadas durante el mismo muestreo de las tortugas marinas de este estudio (septiembre 2019) (SanJuan 2020).

La concentración de metales pesados en agua (Pb As y V), compuestos orgánicos persistentes (e.g. endosulfanes y PCB's totales) medidos en plasma y sangre, respectivamente, de tortuga verde fue mayor en Punta Herrero y Xcalak (SanJuan 2020). Dichos sitios no son los más turísticos de Quintana Roo, pero si se ha comprobado que Punta Herrero está siendo más afectada por el arrastre químico de sustancias resultado de actividades agropecuarias y Xcalak recibe constante contaminación que proviene del Rio Hondo proveniente del Caribe Central (Fernández et al. 2007). Se ha determinado que los niveles de Fe, Zn, Ar, Cu y Pb son más altos en ambas zonas de Punta Herrero y Xcalak en comparación con los lugares turísticos (Mahahual y Akumal) que se creía que se verían más afectados (Fernández et al. 2007). La cuantificación de buds y diversas anormalidades

nucleares confirman así, el daño evidenciado en los núcleos de eritrocitos de tortuga verde que habita en estas bahías de Quintana Roo.

Estudios diversos confirman que no solo el daño por sustancias genotóxicas se generan directamente por absorción en el ambiente sino también, por la alimentación y biomagnificación que se genera principalmente por el tipo de alimentación que las tortugas marinas mantienen y el nivel trófico que ellas ocupan (Maffucci et al. 2005). Los contaminantes que están en los suelos pueden transferirse a la costa por escurrimiento, los cuales son absorbidos por los pastos marinos y otras especies de fauna marina de las que las tortugas se alimentan, favoreciendo la biomagnificación y agravando el problema (Barrera- Escorcia y Namihira-Santillan 2004; Gonzáles 2015). La presencia de compuestos orgánicos persistentes y metales pesados como el Pb, Hg, entre otros se ha asociado con alteraciones fisiológicas, estrés oxidativo, supresión del sistema inmune y con la formación de fibropapilomas en tortugas marinas (Keller et al. 2006; Labrada-Martagón et al., 2011; Camacho et al 2012; Tremblay et al., 2017).

Por ende siendo las tortugas marinas elementos en estrecha relación con todos los hábitats costeros y oceánicos no solo a escala local sino global, todos los factores externos que afectan tanto a los arrecifes coralinos, pastos marinos y playas afectaran la salud de estos especímenes (biomarcadores) y nos darán un indicativo del daño en el ecosistema que si no se generan medidas de control a tiempo podrán llevar a la extinción de flora, ecosistema y fauna presente en ella (González 2015; Labrada et al 2011).

Por otro lado aunque en otros estudios como en el de Carneiro y colaboradores (2016) si se han obtenido resultados significativos en cuanto a la correlación entre las tallas de las tortugas verdes y la frecuencia de los diferentes tipos de anomalías en eritrocitos, ellos evidencian que el 52% de los especímenes en su estudio estaban afectados con fibropapilomatosis y en nuestro estudio el porcentaje de fibropapilomatosis no era significativo para poder asociar los resultados obtenidos por lo cual descartamos que la talla de los individuos sea un determinante en la cantidad de anomalías nucleares presentes.

#### **9.4 Morfología de anomalías nucleares**

Por medio del índice de redondez, se logró comprobar que los eritrocitos circulares (control) presentan los mayores valores promedio al resto de los tipos celulares como era de esperarse. Por tanto, los resultados indican que la técnica de medición si es eficiente evidenciando la morfología de membrana del núcleo de las células



circulares, presentando estas un mayor índice de redondez (Figura 14). Los eritrocitos circulares, se consideran células inmaduras normales en las tortugas marinas (Montilla et al. 2006; Martínez et al. 2011; Ramírez et al. 2012). Sin embargo, el índice empleado no fue eficiente denotando una diferencia significativa entre los diferentes tipos de anormalidades nucleares que nos confirman un daño en el núcleo. No se encontraron diferencias significativas en el índice de redondez del núcleo entre ninguna de las células anormales cónicas, con curvatura invertida e indeterminadas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el índice de redondez entre los eritrocitos sanos (elongados) y los anormales cuando fueron éstos últimos agrupados. Los resultados evidencian que el índice propuesto no es el adecuado para evaluar este tipo de células ya que no se diferencia una célula sana de una anormal.

Con los resultados obtenidos, se confirmó que este índice si funciona para detectar redondez en células pero no para los propósitos de nuestro estudio ya que no se pudo descartar por medio de las mediciones las medidas de eritrocitos afectados por anormalidades importantes como lo son las que se clasificaron como anormalidades indeterminadas las cuales incluyen núcleos lobulados, ampollados. Se vuelve necesario seguir explorando otros tipos de índices de la morfología de membrana que pudieran servir como un marcador simple de anormalidades nucleares en estos organismos.

## 10. CONCLUSIONES

- En este estudio se describen anomalías nucleares en *C. mydas* por primera vez, tales como: núcleos lobulados, con muesca, con ampolla y en forma de ocho.
- Las tortugas verdes de las zonas de captura de Xcalak y Punta Herrero presentaron mayor frecuencia de las anomalías nucleares identificadas como núcleos lobulados, muescas, ampollados (buds) y en forma de ocho, sugiriendo que a pesar de ser reservas naturales protegidas, los organismos se encuentran expuestos a contaminantes genotóxicos.
- No hay diferencias significativas en la frecuencia de MN entre las zonas de estudio, pero se presenta mayor proporción de organismos afectados en la Bahía de Akumal y Xcalak donde al menos el 50% de sus individuos presentaron MN.
- Los sitios con mayor afluencia turística como Akumal se ven mayormente afectados por la exposición continua a contaminantes químicos derivados de estas actividades, por ende la problemática es que los especímenes que ahí se encuentran puedan presentar alteraciones fisiológicas, estrés oxidativo y supresión del sistema inmune que conlleva a la formación de fibropapilomas.
- El índice de redondez utilizado no resultó útil para diferenciar entre eritrocitos sanos y aquellos con anomalías en su núcleo.
- En Punta Herrero y Xcalak a pesar de ser reservas naturales protegidas, fueron las zonas más afectadas con la presencia de buds y anomalías debido a la contaminación de metales pesados y compuestos orgánicos persistentes presentes en agua que se evidencian en estudios previos.
- El ensayo de MN resultó ser una herramienta muy útil para evaluar daño genotóxico en *C. mydas* en vida libre ya que es económico, sencillo de realizar, de fácil interpretación y específico a contaminantes químicos ambientales.
- Este estudio provee un nuevo aporte a nuestro país El Salvador y brinda herramientas importantes para estudios futuros en animales silvestres de

vida libre que puedan ser bioindicadores para el control del ecosistema en nuestro país.

## 11. RECOMENDACIONES

- Evaluar la utilidad de otros índices de morfología nuclear que permita diferenciar entre células sanas y anormales, enfocado más en las formas de elipse de los eritrocitos de tortugas marinas más que en la redondez.
- Impulsar las investigaciones para utilizar la prueba de MN en especies de nuestro país El Salvador, pues éste forma parte de la región migratoria del ciclo de vida de las mismas especies de tortugas marinas que se encuentran en México.
- Monitorear el estado de conservación de las zonas marino-costeras de Xcalak y Punta Herrero y agregar medidas de conservación para evitar la contaminación de las aguas con metales pesados y otras sustancias que afecta el ecosistema y la vida marina de Quintana Roo.
- Implementar controles en el uso de pesticidas en el área de agricultura, medidas restrictivas en lugares turísticos y mejores gestiones para el tratamiento de aguas residuales para evitar que estas afecten a las especies de tortugas marinas y su ecosistema.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

**Aguirre, AA. 1991.** Green turtle fibropapilloma: an epidemiologic perspective. In: Balazs, G.H; Pooley, S.G. (Eds. Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. U.S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo, pp. 107–113.

**Anan, Y. Kunito, T. Watanabe, I. Sakai, H. Tanabe, S. 2001.** Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from Yaeyama islands, Japan. Environ Toxicol Chem. 20(12):2802- 2814.

**Baessee, CQ; de Magallanes-Tolentino, VC; da Silva. AM; Silva. AA; Ferreira. GA; Mendes Paniago LP; Nepomuceno. JC; de Melo. C. 2014.** Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. Ecotoxicology and Environmental Safety, 115, 223- 228.

**Baessee, C.Q., Tolentino, V.C.DEM., Da silva, A.M., Silva, A.DEA., Ferreira, G.A., Paniago, L.P.M., Nepomuceno, J.C. ,De Melo, C. 2015.** Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. Ecotoxicology and Environmental Safety 115:223–228.

**Baker, D.M; Jordán-Dahlgren, E; Maldonado, MA; Harvell, C. D. 2010.** Sea fan corals provide a stable isotope baseline for assessing sewage pollution in the Mexican Caribbean. Limnol. Oceanogr., 55 (5): 2139-2149.

**Barrera-Escorcía, G; Namihira-Santillán, PE. 2004.** Contaminación microbiológica en la zona costera de Akumal, Quintana Roo, México. Hidrobiológica, 14(1): 27-35.

**Barsiene, J; Dedonyte, V; Rybakovas, A; Andreikenaite, A; Ketil Andresen, O. 2006.** Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. Aquatic Toxicology. 78S: S99-S104.

**Bhattathiri, NV; Bindu, L; Remani, P; Chandralekha, B. & Nair, KM. 1998.** Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells: serial cytologic evaluation. *Acta Cytol.* 42(5):1084-90.

**Bishop, C.A; Lean, DR; Brooks, R.J. 1995.** Chlorinated hydrocarbons in early life stages of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from a coastal wetland on Lake Ontario, Canada. *Enviro Toxicol Chem.* 14(3):421-426.

**Bolognesi, C; Knasmueller, S; Nersesyan, A; Thomas, P; Fenech. M. 2013.** The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation research.*, 753: 100-113.

**Briseño Dueñas, R. 2016.** Las tortugas marinas y sus playas de anidación en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. P066. México D. F.

**Caliani, C., Tommaso, M., Giannetti, L., Marsili, S., Casini, M., Fossi, C. 2014.** First application of comet assay in blood cells of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) Mediterranean. *Marine environmental research.*96: 68-72.

**Camacho, M; Luzardo, O; Orós, J; Calabuig, P; Zumbado, M; Pinós, J; Ld, B. 2012.** Contaminantes orgánicos persistentes en plasma de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias. 45–50. <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/ibc-111467>.

**Camacho, M; Boada, LD; Oros, J; López, P; Zumbado, M; Almeida González, M; Luzardo, OP. 2014.** Monitoring organic and inorganic pollutants in juvenile live sea turtles: Results from a study of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata* in Cape Verde. *Science of the total environment.* 481: 303-310.

**Carneiro da Silva, C; Klein, R; Barcarolli, I; Bianchini, A. 2016.** Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology.*, 170: 42-51.

**Caraffa, E; Bionda, C; Pollo, FE; Salas, NE; Martino, AL. 2013.** Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicol. Argent.* (2013) 21 (2): 78-84.

**Carrasco KR; Tilbury KL; Myers MS. 1990.** Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effect. *Aquatic Sci.* 47:2123-2136.

**Casal, AB; Freire, F; Bautista Harris, G; Arencibia, A; Oros, J. 2007.** Ultrastructural Characteristics of Blood Cells of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *Anat. Histol. Embryol.* 36:332–335.

**Casini, S; Caliani, C; Giannetti, L; Marsili, S; Maltese, S; Copola, D; Bianchi, N; Tommaso, C; Ancora, S; Carusso, C; Furi, G; Parga, M; Dagostino, A; Fossi, M. 2018.** First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol C. *Science of the total environment.* 631-632:1221-1233.

**Caurant, F; Bustamante, P; Bordes, M; Miramand, P. 1999.** Bioaccumulation of Cadmium, Copper and Zinc in some tissues of tree species of marine turtles stranded along the french atlantic coasts. *Marine Pollution Bulletin.* 38 (12): 1085-1091.

**Cavas T; Ergene-Gozukara S. 2005.** Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46:64-70.

**Clark D; Bickham J; Baker D; Cowman D. 2000.** Environmental contaminants in Texas, USA. Wetland reptiles: evaluation using blood samples. *Environ Toxicol Chem.* 19(9):2259-2265.

**Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2010.** *Reserva de la Biósfera Sian Ka'an.* Retrieved from <https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/reservasBiosfera3.pdf>.

**CONANP (Comisión nacional de áreas naturales protegidas). 2016.** Descripción de la problemática del Refugio Bahía de Akumal. 16 p.

**Crain D; Guillette Jr. L. 1998.** Reptiles as models of contaminant induced endocrine disruption. *Anim Repro Sci.* 53:77-86.

**Da Silva, C. C; Klein, R. D; Barcarolli, I. F; & Bianchini, A. 2016.** Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*, 170, 42–51. Consultado el 11 de mayo del 2021. Disponible en línea en <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007>.

**Diario Oficial de la Federación. (DOF). (2003).** Decreto por el que se declara área natural protegida, la región conocida como Arrecifes de Xcalak (1 de agosto de 2003). México, D.F.

**Diario Oficial de la Federación. (DOF). (2016).** Acuerdo por el que se da a conocer el Programa de Protección del Área de Refugio para la Protección de Especies Marinas denominada Bahía de Akumal (7 de marzo de 2016). México, D.F.

**Fenech, M. 2000.** The in vitro micronucleus technique. *Mutation research.* 455: 81-95.

**Fenech, M; Crott JW. 2002.** Micronuclei, nucleoplasmatic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes- evidence for breakage- fusion bridge cycles in the cytokinesis- block micronucleus assay. *Mutation research* 504.131-136.

**Fenech M; Bonassi S. 2011.** The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26(1):43-49.

**Fernández, A; Singh, A; & Jaffé, R. 2007.** A literature review on trace metals and organic compounds of anthropogenic origin in the Wider Caribbean Region. *Marine*



**Finlayson, K. A; F. D. L. Leusch, J. P. van de Merwe. 2016.** The current state and future directions of marine turtle toxicology research. *Environment International*. 94: 113-123.

**Flores Fernández, E.M; del Carmen Caraballo Suniaga, S; Albarado Ysasis, L.S. 2014.** Características tintoriales de *Neisseria gonorrhoeae* por la tinción diferencial de fluorescencia modificada. *Saber. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*. 26(3):281-288. Consultado el 10 de septiembre del 2019. Disponible en línea en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427739473007>.

**Furnus, GNA; Caffetti, JD; García, EM; Benítez, MF; Pastori, MC; Fenocchio, AS. 2014.** Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). *Braz. J. Biol.* 74 (1): 217-221.

**Gaumer, AEH; Goodnight, CJ. 1957.** Some aspects of the hematology of turtles as related to their activity. *American Midland Naturalist*. 58(2):332-340.

**Gauthier, J; Dubeau, H; Rassart, E. 2003.** Evaluation of genotoxic effects of environmental contaminants in cells of marine mammals with particular emphasis on beluga whales. In: *Toxicology of marine mammals*. New York: CRC Press. p. 417-441.

**Gokalp Muranli FD; Guner U. 2011.** Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation research* 726:104-108.

**Golet, W; Haines, T. 2001.** Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as monitors for mercury contamination of aquatic environments. *Environ Monit Assess*. 71:211-220.

**Gómez-Meda, B.C; Zamora-Pérez, A; Luna-Aguirre, J; González-Rodríguez, A; Ramos Ibarra, M.L; Torres-Bugarín, O; Batista-González, C.M; Zúñiga-**

**González, G; 2006.** Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology* 35, 206-210.

**González, D. 2015.** Determinación de plaguicidas organoclorados y su relación con parámetros sanguíneos en tortugas Caguama (*Caretta caretta* (Linnaeus, 1758)) de Quintana Roo, México. Tesis Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural. Campeche. Mexico Colegio de la Frontera Sur. 134 p.

**Grisolia, C. K; y C. M. Torres-Cordeiro. 2000.** Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*. 23 (1): 235-239.

**Hamann, M; Godfrey, M.H; Seminoff, J.A; Arthur, K; Barata, P.C.R; Bjorndal, K.A.,Bolten, A.B; Broderick, A.C; Campbell, L.M; Carreras, C; Casale, P.,Chaloupka, M; Chan, S.K.F; Coyne, M.S. ; Crowder, L.B; Diez, C.E; Dutton, P.H.,Epperly, S.P; FitzSimmons, N.N; Formia, A; Girondot, M; Hays, G.C; Cheng, I.J; Kaska, Y; Lewison, R; Mortimer, J.A; Nichols, W.J; Reina, R.D; Shanker, K; Spotila, J.R; Tomas, J; Wallace, B.P; Work, T.M; Zbinden, J; Godley, B.J; 2010.**Global research priorities for sea turtles: informing management and conser-vation in the 21st century. *Endanger. Species Res.* 11, 245e269.<https://doi.org/10.3354/esr00279>

**Hopkins, WA. 2000.** Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem.* (19):2391-2393.

**Hoshina, M. M; D. de Franceschi y M. A. Marin-Morales. 2008.** Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*. 656: 44- 48.

**Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2018.** Consultado el 12 de julio del 2021. Disponible en línea en <https://imagenestotales.com/mapa-quintana-roo-municipios/>.

**Islas Madrid, NL. 2020.** Indicadores de estrés oxidativo de la población de tortuga blanca (*Chelonia mydas*) que habita en el Caribe Mexicano. Tesis Maestro en

Ciencias. Baja California Sur. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 143p.

**Jones, K., Ariel, E., Burgess, G., and Read, M. 2016.** A review of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet. J.* 212, 48–57. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.041.

**Keller, J. M., McClellan-Green, P. D., Kucklick, J. R., Keil, D. E., & Peden-Adams, M. M. 2006.** Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: Comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 70–76. Consultado en línea el 26 de febrero del 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1289/ehp.8143>.

**Keller, J.M. 2013.** Exposure to and effects of persistent organic pollutants, in: J. Wyneken, K.J. Lohmann, J.A. Musick (Eds.). *The biology of sea turtles Vol III*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 285-328.

**Kirsch Volders M; Plas G; Elhajouji A; Lukamowicz M; Gonzalez L; Vande Loock K; Decordier I. 2011.** The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 85:873–899.

**Komoroske, L. M; R. L. Lewison, J. A. Seminoff, D. D. Deheyn, P. H. Dutton. 2011.** Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego. CA. *Chemosphere*. 84: 544-552.

**Labrada-Martagón, V; P. A. Tenorio-Rodríguez, L. C. Méndez Rodríguez y T. Zenteno-Savín. 2011.** Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 154: 65–75.

**Labrada Martagón, V. 2018.** Biomarcadores y salud ecológica. *Recursos Naturales y Sociedad*. 2(2):11-13.

**Labrada-Martagón, V., Muñoz-Tenería, F. A; Herrera-Pavón, R. y Negrete-Philippe, A. N. 2017.** Somatic growth rates of immature green turtles *Chelonia mydas* inhabiting the foraging ground Akumal Bay in the Mexican Caribbean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 487: 68–78.

**Labrada-Martagón, V; Muñoz-Tenería; F.A; Zenteno-Savin, T. 2019.** Standardized Micronucleus Assay for Peripheral Blood from Sea Turtles. *Chelonian Conservation and Biology*. 18(2): 1-10.

**Lee Rangel, HA; Ramírez Tobias, HM; Roque Jiménez, JA. 2016.** Perspectivas y avances de la producción animal en México. UASLP (Universidad de San Luis Potosí) 1 ed. San Luis Potosí, MX. Universitaria Potosina. 554-559.

**López-Mendilaharsu, M., Gardner, S. C., and Seminoff, J. A. 2002.** Feeding ecology of the East Pacific green turtle (*Chelonia mydas agassizii*) in Bahía Magdalena, B.C.S., Mexico. in, ed. J. A. Seminoff (NOAA), 218–219.

**Maffucci, F; Caurant, F; Bustamante, P; Bentivegna, F. 2005.** Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere*. 58:535-542.

**Martínez Silvestre, A; Lavín, S; Cuenca, R. 2011.** Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clin. Vet. Peq. Anim.* 31(3): 131-141.

**Matheus Lobo, T; Bolaños, A. 2014.** Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*. 18 (2):19-20. Consultado el 20 de septiembre del 2019. Disponible en línea en <http://www.redalyc.org/pdf/3759/375939026005.pdf>.

**Molina, A. L., and Van Tussenbroek, B. I. 2014.** Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea turtles. *MEPS* 517, 143–157.

**Montaño Medrano, B.E. 2013.** Análisis Sanguíneos Comparativos de Tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*) en Playa Agua Blanca, B.C.S., México. Tesis Biólogo Marino. Baja California Sur, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 93 p. Consultado el 25 de septiembre del 2019. Disponible en línea en <http://biblio.uabcs.mx/tesis/te2886.pdf>.

**Montilla, AJ; Hernández JL; Alvarado MC. 2006.** Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la alta Guajira. Revista Científica FCV – LUZ, XVI (3): 219-226.

**Moran, G; Dalto, J. 2015.** Las tortugas son protegidas en El Salvador. Diario Digital Contra Punto. San Salvador, El Salvador. 30 Jul.: 1. Consultado en línea el 30 de Julio del 2020. Disponible en línea en <http://www.contrapunto.com.sv/archivo2016/reportajes/las-tortugas-son-protegidas-en-el-salvador#:~:text=Los%20330%20kil%C3%B3metros%20de%20la,tortugas%20marinas%20que%20se%20conocen.&text=Las%20tortugas%20que%20se%20caracterizan,equilibrio%20ecol%C3%B3gico%20en%20las%20playas>.

**Muñoz-Tenería, F., Herrera-Pavón, R. L, Negrete-Philippe, A. C. Work T. M; Labrada-Martagón V; González-Hernández, M. 2016.** Evaluación de la presencia de fibropapilomas en tortugas marinas de Quintana Roo. Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS, Pp. 61.

**Muñoz- Tenería, F. A., R. L. Herrera-Pavón, A. C. Negrete-Philippe, G. Maldonado, M. Tzeek-Tuz, T.M. Work, V. Labrada-Martagón, M. González-Hernández. 2016.** Evaluación de la presencia de fibropapilomas en las tortugas marinas de Quintana Roo. Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. PROCER/ DRPYCM/261.2015. 64 p.

**Muñoz- Tenería, F. A., R. L. Herrera-Pavón, A. C. Negrete-Philippe, G. Maldonado, M. Tzeek-Tuz, T.M. Work, V. Labrada-Martagón, M. González-Hernández y P. E. Días-Flores. 2017.** Seguimiento de las acciones para la evaluación de la presencia de fibropapilomas en tortugas marinas de Quintana Roo. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. PROCER/ DRPYCM/346/2016. 55p

**Muñoz, GJ. 2019.** ANOVA Medidas Repetidas. Consultado el 12 de julio del 2021. Disponible en línea en <https://rpubs.com/gmunoz/rm-anova>.

**Nikolouzakis TK; Vassilopoulou L; Fragkiadaki P; Sapsakos TM; Papadakis G; Spandidos DA; Tsatsakis AM; Tsiaoussis J. 2018.** Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncology Reports*. 39:2544-2472.

**Ortegón Torres, L; Ordoñez Osorio, K; Henao Murrillo, B; Guio Duque, A; Pelaes Jaramillo, C. 2014.** Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima. (Original en ingles) Genotoxic effects of environmental contaminants on commercial fish of Magdalena river, in the department of Tolima. 1 (9):21-53.

**Peace, BE; Succop, P. 1999.** Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values. *Mutation research*. 425:225-230.

**Periódico Oficial. (2002).** Decreto por el cual se establece el Programa de Ordenamiento Ecológico de la zona costera de la Reserva de la Biósfera de Sian Ka'an. (pp. 1–30).

**Poletta, GL; Larriera, A; Kleinsorge, E; Mudry, MD. 2008.** Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation research*. 650:202-209.

**Ramírez Acevedo, L.M; Martínez Blas, S. S; Fuentes Mascorro, G. 2012.** Hemograma y características morfológicas de las células sanguíneas de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de Oaxaca, México. *Revista Científica*. XXII (5):468-476. Consultado el 14 de mayo del 2020. Disponible en línea en <https://www.redalyc.org/pdf/959/95923384011.pdf>.

**Rees A; Alfaro-Shiqueto J; Barata PCR; Bjorndal KA; Bolten AB; Bourjea J; Broderick AC; Campbell LM; Cardona L; Carreras C; Casale P; Ceriani SA; Dutton PH; Eguchi T; Formia A; Fuentes MMPB; Fuller WJ; Girondot M; Godfrey MH; Hamann M; HartKM, Hays GC; Horchseid S; Kaska Y; Jensen MP;**

**Mangel JC; Mortimer JA; Naro-Maciel E; Nichols WJ; Phillott AD; ReinaRD; Revuelta O; Schofeld G; Seminof JA; Shanker K; Tomás J; van de Merwe JP; van Houtan KS; Vander ZANDEN HB; Wallace BP; Wedemeyer-Strombel KR; Work TM; Godley BJ. 2016.** Are we working towards global research priorities for management and conservation of sea turtles? *Endanger Species Res* 31:337–38.

**Rodríguez Salazar, CL. 2018.** Caracterización de la frecuencia de anomalías nucleares en sangre periférica de la tortuga blanca (*Chelonia mydas*) de Quintana Roo. Tesis Lic. en Biología. San Luis Potosí, México. UASLP. 65 p.

**Ruiz Alonso, M. 2008.** Biología de *Chelonia mydas* en Akumal, México. Tesis Master. Quintana Roo, México. 62 p.

**SanJuan Meza, XS. 2020.** Evaluación de la respuesta clínica y genotóxica por la exposición a plomo y compuestos orgánicos persistentes en organismos inmaduros de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en Quintana Roo, México. Tesis Maestría. San Luis Potosí, México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 198 p.

**Santidrián, P. 2011.** Cambio climático y tortugas marinas. *Revista de Ciencias Ambientales Tropical Journey of Environmental Sciences*. Vol 41 (1): 5-10. Consultado el 1 de septiembre del 2019. Disponible en <file:///home/chronos/u-e400f2ca357ebe9381e0e63122d0c5235a777a7e/Downloads/DialnetCambioClimaticoYTortugasMarinas-5536132.pdf>.

**Schmid, W. 1975.** The micronucleus test. *Mutation Research*. 31: 9-15.

**Sears, D; Udden MD; Udden Mark. 2012.** Howell-Jolly Bodies: A brief historical review. *The American Journal of Medical Sciences*. 343(5):407-409.

**Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2007.** Estudio técnico justificativo para declarar área de refugio para proteger tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) y tortuga caguama (*Caretta caretta*); cuatro especies de corales: cuerno de alce (*Acropora palmata*), cuerno de ciervo (*Acropora cervicornis*), (*Plexaura homomalla*) y (*Plexaura dichotoma*), tres especies de magle: *Laguncularia racemosa*, *Conocarpus erectus* y *Rhizophora mangle*; tres especies de pastos marinos: *Thalassia testudinum*,

Syringodium filiforme y Halodule wrightii, todos ubicados en el área marina conocida como Bahía de Akumal, Quintana Roo. México. 45 p.

**Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2016b.** Descripción de la problemática del Refugio Bahía de Akumal. Programa de protección del Refugio Bahía de Akumal. 16p.

**Seminoff, J.A. 2004.** *Chelonia mydas*. The IUCN Red List of Threatened Species.

**Shi, Q. & King, R. W. 2005.** Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*, 437(7061):1038-42.

**Shimizu. N; Itoh. N; Utiyama. H; Wahl. G. M. 1998.** Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. *The Journal of Cell Biology*, 140 (6): 1307-1320.

**Shugart. L.R. 2000.** DNA damage as a Biomarker of Exposure. *Ecotoxicology*, 9: 329 - 340.

**Schlenk, D, Di Giulio, RT .2002.** Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: ADAMS SM (ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. AFS, Bethesda, pp. 14-17.

**Slater, K. 2014.** CEA/Operation Wallacea. Fibropapillomatosis en *Chelonia mydas* en relación de calidad de agua y turismo en la Bahía de Akumal, México. CEA/Operation Wallacea, Lincolnshire. 38p.

**Souto, HN; de Campos Junior, EO; Campos, CF; Rodríguez, TS; Barbosa Pereira, B; Morelli, S. 2018.** Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 25:24084-24092.

**Stegeman, J. J; M. Brouwer, R. T. Di Giulio, L. Förlin, B. A. Fowler, B. M. Sanders y P. A. Van Veld. 1992.** *Molecular* 20. *Revista Digital de Divulgación*



Científica, 2018 BIOMARCADORES Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. 235–335. En: Huggett, R. J., R. A. Kimerle, P. M. Jr. Mehrle y H. L. Bergman. (Eds.). Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers. Boca Raton, EU.

**Swarthout, R.F; Keller, J.M; Peden-Adams, M; Landry, A. M; Fair, P.A; Kucklick, J. R. 2010.** Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere* 78: 731–741.

**Sakai, H; Saeki, K; Ichihashi, H; Kamezaki, N; Tanabe, S; Tatsukawa, R. 2000.** Growth-related changes in heavy metal accumulation in green turtle (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Okinawa, Japan. *Arch Environ Contam Toxicol.* (39):378–385.

**Taylor, K.W; Kaplan, H.M; Hirano, T. 1968.** Electron Microscope Study of Turtle Blood Cells. *Cytologia.* 28: 248-256.

**Thomas, P.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S; Fenech, M. 2009.** Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.*, 4(6):825-837. Consultado el 15 de septiembre del 201. Disponible en línea en [https://www.researchgate.net/publication/47701772\\_Buccal\\_Micronucleus\\_Cytome\\_Assay](https://www.researchgate.net/publication/47701772_Buccal_Micronucleus_Cytome_Assay).

**Tolbert, P. E.; Shy, C. M. & Allen, J. W. 1991.** Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.*, 134(8):840-50. Consultado el 13 de septiembre del 2019. Disponible en línea en <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/134/8/840/148462>.

**Torres Bugarin, O; Ramos Ibarra, ML. 2013.** Utilidad de la prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology.* 31(2):650-657. Consultado el 20 de septiembre del 2019. Disponible en línea en <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v31n2/art50.pdf>.

**Tremblay, N., Ortíz Arana, A., González Jáuregui, M., & Rendón-von Osten, J. 2017.** Relationship between organochlorine pesticides and stress indicators in hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting at Punta Xen (Campeche), Southern Gulf of Mexico. *Ecotoxicology*, 26(2), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1752-5>.

**Urgutas, IH; Sevinc, M; Yildirinham, HS. 2003.** Erythrocyte Size and Morphology of Some Tortoises and Turtles from Turkey. *Zoological studies*. 42(1):173-17.

**Van Tussenbroek, B. I., Cortés, J., Collin, R., Fonseca, A. C., Gayle, P. M. H., Guzmán, H. M., et al. 2014.** Caribbean-wide, long-term study of seagrass beds reveals local variations, shifts in community structure and occasional collapse. *PLoS One* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0090600.

**Wood, FE; Ebanks, GK.1984.** Blood Cytology and Hematology of the Green Sea Turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica*. 40(3):331-336. Consultado el 27 de septiembre del 2019. Disponible en línea en [https://www.jstor.org/stable/3892302?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/3892302?seq=1#page_scan_tab_contents).

**Work, TM; Raskin, RE; Balasz, GH; Whittaker, SD. 1998.** Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. Gainesville, FL. v 59, t. 10, 1256 p.

**Zamora-Perez, A; Camacho-Magaña, C; Gómez-Meda, B; Ramos-Ibarra, M; Batista-González, C; Zúñiga-González, G. 2006.** Importance of spontaneous micronucleated erythrocytes in bottlenosedolphin (*Tursiops truncatus*) to marine toxicology studies. *Acta BiolHung*. 57(4):441-8.

**Zar, J. H.1996.** Biostatistical Analysis. 3ª ed. PRENTICE HAL.

**Zúñiga-González, G., O. Torres-Bugarín, M. P. Ramírez-Muñoz, A. Ramos, E. Fanti-Rodríguez, E. Portilla, D. García-Martínez, J. M. Cantú, M. P. Gallegos-Arreola y J. Sánchez-Corona. 1996.** Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*. 369: 123-127.

**Zúñiga-González, G; Torres-Bugarín, O; Luna-Aguirre, J; González-Rodríguez, A; Zamora-Pérez, A; Gómez-Meda, B. C; Ventura-Aguilar, A. J; Ramos-Ibarra, M. L; Ramos-Mora, A; Ortíz, G. G; Gallegos-Arreola, M. P. 2000.** Spontaneous

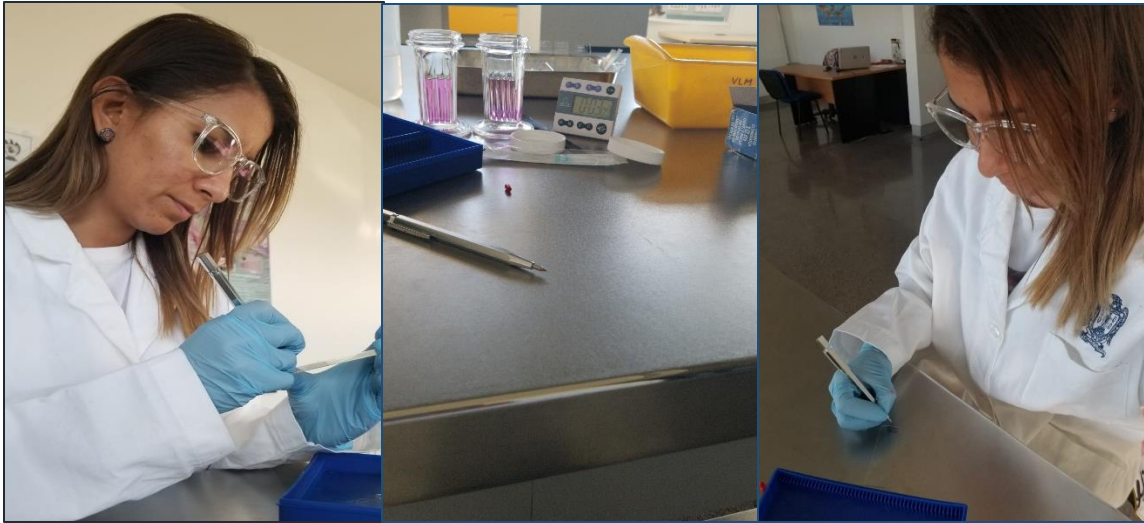
micrunuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research*. 467: 99-103.

**Zurita, J. C., R. Herrera y B. Prezas. 1993.** Tortugas marinas del Caribe. *Biodiversidad Marina y Costera de México* (ed. Salazar-Vallejo NE): 735-750.

**Zurita, JC. 2015.** *Biología y Conservación de las Tortugas Marinas en Quintana Roo*. Tesis Dr. en Ciencias de Biología. Ciudad de México. México. UNAM. 245 p.

### 13. ANEXOS

Anexo-1. Capacitación para el procesamiento de las muestras previamente colectadas en el estado de Quintana Roo.



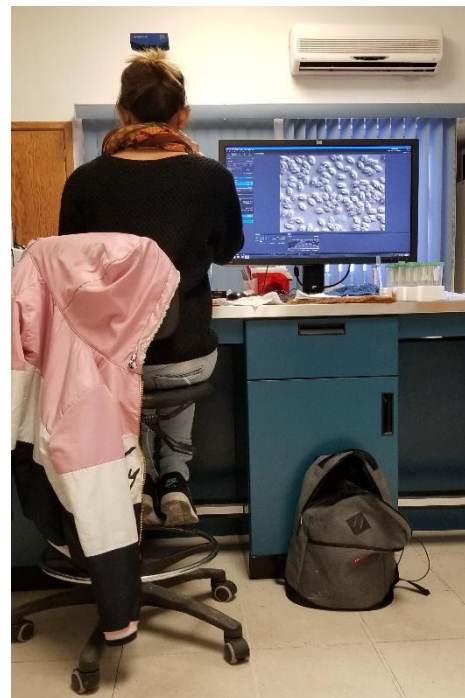
Anexo-2. Tinción de muestras.



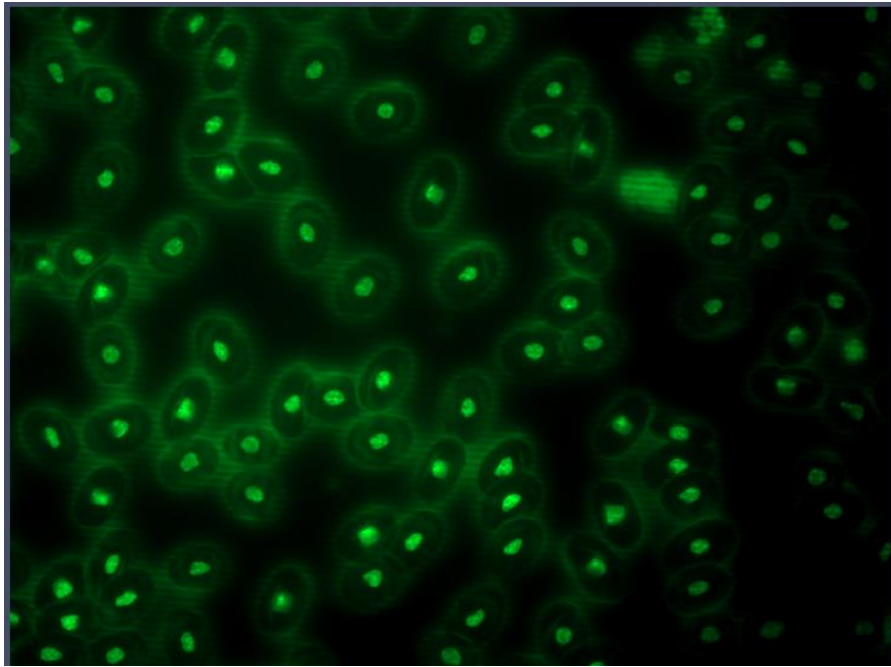
Anexo-3. Preparación de buffers.



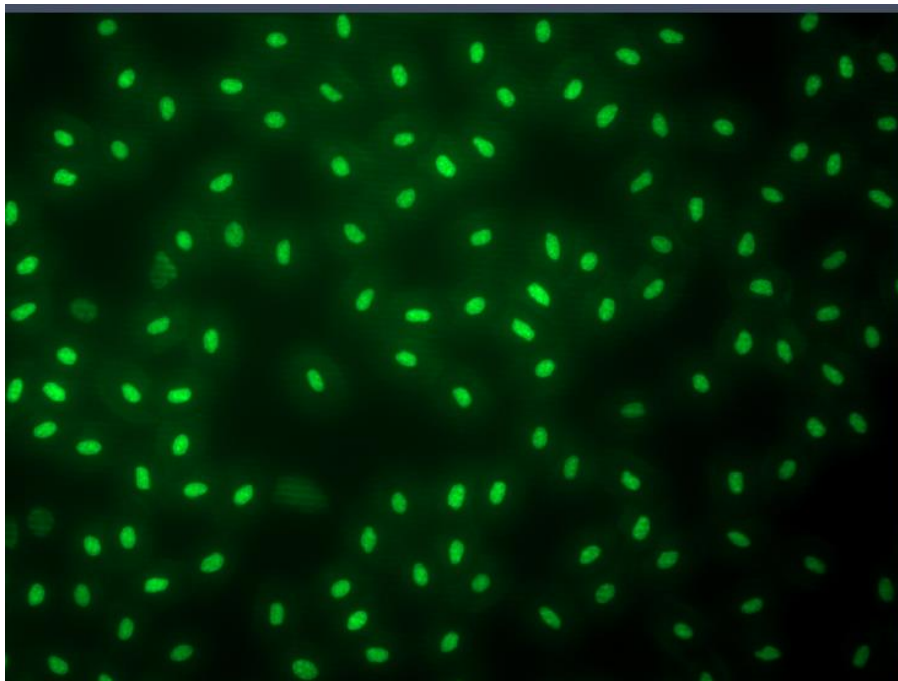
Anexo-4 Toma de fotografías en microscopio de fluorescencia.



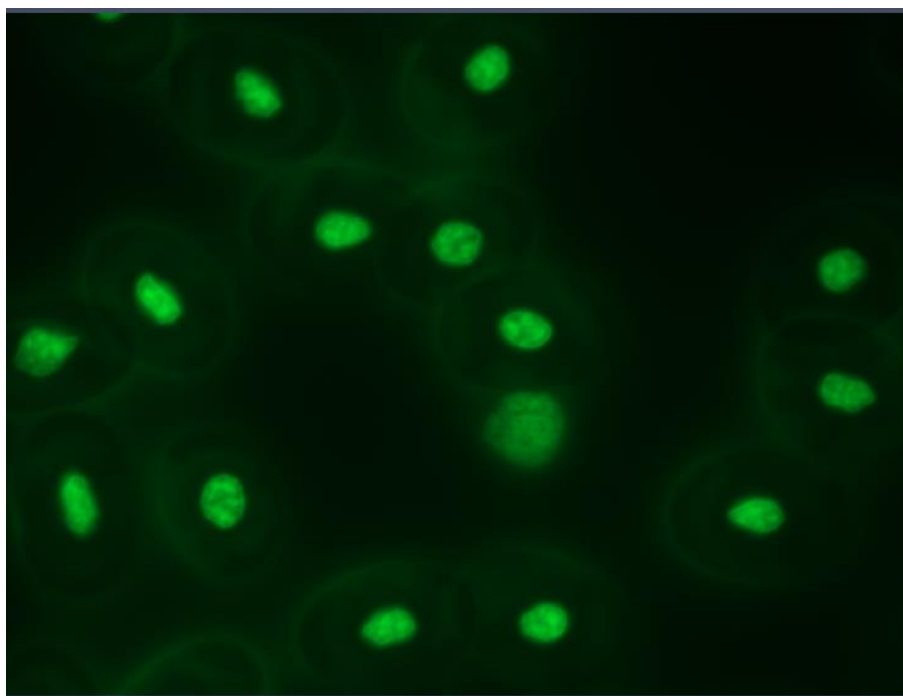
Anexo-5. Conteo de anomalías nucleares por medio de fotografías digitales de microscopio de fluorescencia de alta resolución.



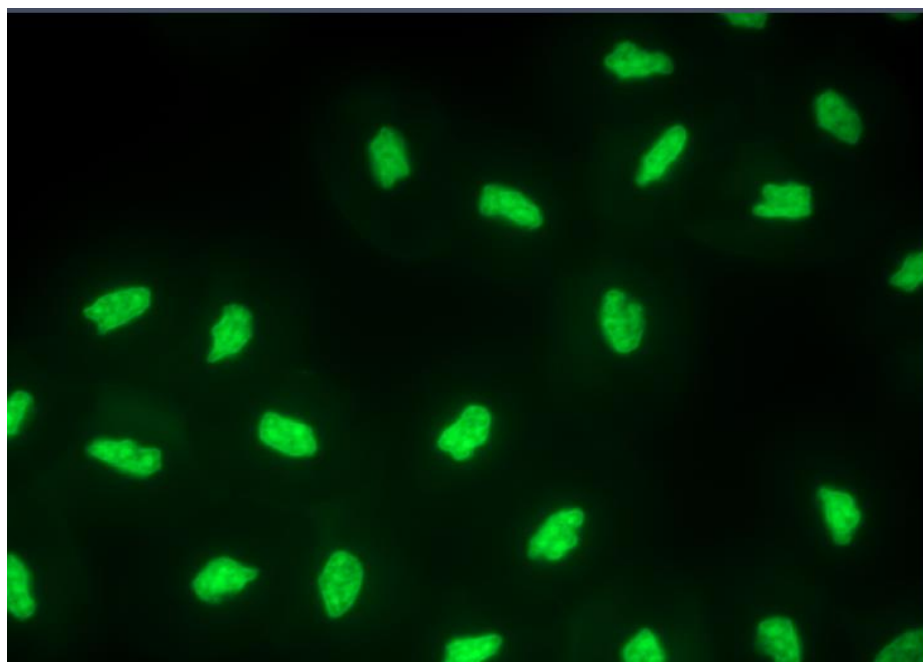
Objetivo 40x. Fotografía AK-53-01



Objetivo 40x. Fotografía PH-18-1



Objetivo 100x. Fotografía AK-53-07



Objetivo 100x. Fotografía PH-16-04