

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DIRECCION DE INVESTIGACION**

AV-2202

NOMBRE DE LA INVESTIGACION.

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.

TÍTULO A OBTENER: Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

AUTORES

Nombre	Institución y Dirección	Teléfono y E-mail	Firma
Br. Guevara Meléndez Aida Mercedes	Cumbres de Santa Tecla polígono H-4 casa #33. La Libertad, Santa Tecla.	7603-6447 aidamiau123@gmail.com	
Profesor Investigador T.C. Vanessa Labrada Martagón	Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.	vanessa.labrada@uaslp.mx 52 (444)826-2300	
MVZ. Fernando Javier Flores Alvarenga	Facultad de Ciencias Agronómicas	fernando.flores@ues.edu.sv 2235-5416	

• **VISTO BUENO DEL COORDINADOR DE PROCESOS DE GRADUACIÓN Y JEFE DE DEPARTAMENTO**

Coordinadora General de Procesos de Graduación del Departamento	Firma
MVZ. M. Sp. María José Vargas Artiga	
Director General de Procesos de Graduación de la Facultad	Firma
Ing. Enrique Alonso Alas García	
Jefe de Departamento	Firma
MV. Ricardo Ernesto Gamero Güandique	
	Sello
Lugar y fecha: San Salvador, Ciudad Universitaria 22 de marzo del 2022	

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.

Guevara-Meléndez, A.M¹, Labrada-Martagón, V², Flores-Alvarenga, F.J²

Resumen

La contaminación de los ecosistemas costeros y oceánicos es de las mayores amenazas para las poblaciones de tortugas marinas, por lo cual el uso de biomarcadores es necesario para identificar de manera temprana cualquier alteración que pudiera favorecer el desarrollo de enfermedades que afecten a las tortugas y por ende a la población humana. El objetivo de este estudio fue describir y cuantificar las diversas anormalidades observadas en núcleos de eritrocitos de sangre periférica de tortuga verde (*Chelonia mydas*) capturadas en tres áreas de alimentación (Akumal, Xcalak y Punta Herrero) en Quintana Roo, México. Se procesaron 34 muestras colectadas durante el mes de septiembre de 2019 a través del protocolo de tinción y cuantificación de anormalidades nucleares específico para la especie. Se caracterizaron por primera vez en tortugas marinas diferentes tipos de anormalidades nucleares clasificados como núcleos lobulados, muescados, ampollados, en forma de ocho y binucleados. La mitad de los organismos bajo estudio presentaron micronúcleos (MN); el resto de las anormalidades se observaron en >90% de las tortugas marinas (n=34). No se encontraron diferencias significativas en el número de micronúcleos, buds y anormalidades nucleares entre sitios de colecta. El 75% de las tortugas verdes de Bahía de Akumal presentaron entre 0-80 buds cuantificados en 2000 eritrocitos y 0-38 anormalidades 2000-1 eritrocitos, mientras que la misma proporción de animales en Bahía de Xcalak y Punta Herrero no presentaron más de 48 buds y 21 anormalidades en 2000 eritrocitos. La mayor frecuencia de MN se cuantificó en los organismos de Bahía de Xcalak, en donde el 75% de las tortugas marinas presentaron hasta 5 MN 2000-1 eritrocitos inclusive. Los resultados sugieren que las tortugas verdes de Bahía de Akumal presentan un daño genotóxico agudo al presentar mayor frecuencia de anormalidades, no MN, probablemente asociado al incremento de toxinas derivadas de las actividades turísticas. Se recomienda continuar el monitoreo de la tortuga marina que habitan en Bahía de Xcalak, dada la elevada frecuencia de MN registrada, la cual evidencia genotoxicidad por exposición a contaminantes químicos, probablemente de origen oceanográfico. Para todas las pruebas estadísticas se consideró un límite de confianza de $p < 0.05$.

Palabras clave: *Chelonia mydas*, anormalidades nucleares, micronúcleos, biomarcador, genotoxicidad.

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. Autopista Norte y Final 25^a, Avenida Norte, Ciudad Universitaria, CP 01101, San Salvador, El Salvador¹. Laboratorio Ecología de la Salud, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Chapultepec #1570, CP. 78295, San Luis Potosí, México². Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. Autopista Norte y Final 25^a, Avenida Norte, Ciudad Universitaria, CP 01101, San Salvador, El Salvador².

DESCRIPTION OF THE FREQUENCY OF ABNORMALITIES AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ERYTHROCYTES NUCLEI OF GREEN TURTLES (*Chelonia mydas*) THROUGH FLUORESCENCE MICROSCOPY IN 3 DIFFERENT STUDY AREAS IN QUINTANA ROO, MEXICO.

Guevara-Meléndez, A.M¹, Labrada-Martagón, V², Flores-Alvarenga, F.J²

Abstract

The pollution of coastal and oceanic ecosystems is one of the greatest threats to sea turtle populations, which is why the use of biomarkers is necessary to early identify any alteration that could favor the development of diseases that affect turtles and the human population. The main objective of the present research was to describe and quantify the different type of nuclear abnormalities in erythrocytes in peripheral blood of the green turtle (*Chelonia mydas*) taken from different feeding areas (Akumal, Xcalak and Punta Herrero) in Quintana Roo, Mexico. The research was carried out in September 2019 with 34 samples that were characterized and their frequency quantified, using the specific cell staining protocol of the observation of nucleic acids in sea turtles. For the first time, different types of nuclear abnormalities in sea turtles were characterized and classified as lobulated, notched, blebbed, eight-shaped and binucleated nuclei. Half of the organisms under study presented micronucleus (MN), the rest of the abnormalities were observed in >90% of the sea turtles (n=34). No significant differences were found in the frequency of micronucleus, buds and nuclear abnormalities between collection sites. The 75% of green turtles of Akumal Bay presented between 0-80 buds quantified in 2000 erythrocytes and 0-38 abnormalities 2000-1 erythrocytes while the same proportion of animals in Xcalak and Punta Herrero did not presented more than 48 buds and 21 abnormalities in 2000 erythrocytes. The highest frequency of MN was quantified in organisms of Xcalak Bay, were 75% of sea turtles presented even up to 5 MN 2000-1 erythrocytes. The results suggest that the green turtles from Akumal Bay present an acute genotoxic damage by presenting a higher frequency of abnormalities, no MN, probably associated with the increase in toxins derived from tourist activities. It is recommended to continue monitoring the sea turtles that inhabit Xcalak Bay, given the high frequency of MN recorded, which shows genotoxicity due to exposure to chemical contaminants, probably of oceanographic origin. For all statistical tests a confidence limit of $P < 0.05$ was considered.

Key words: *Chelonia mydas*, nuclear abnormalities, micronucleus, biomarkers, genotoxicity.

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. Autopista Norte y Final 25^a, Avenida Norte, Ciudad Universitaria, CP 01101, San Salvador, El Salvador¹. Laboratorio Ecología de la Salud, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Chapultepec #1570, CP. 78295, San Luis Potosí, México². Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. Autopista Norte y Final 25^a, Avenida Norte, Ciudad Universitaria, CP 01101, San Salvador, El Salvador².

1. INTRODUCCIÓN.

Se sabe que el ensayo de micronúcleos (MN) es una técnica práctica, económica, accesible tecnológicamente y universalmente validada, útil para evaluar el daño al ADN inducido por agentes genotóxicos (Lee Rangel et al. 2016). Esta técnica, es sencilla, sensible e incrementa la potencia estadística de los estudios al contabilizar miles de células. Así mismo, se ha adaptado y validado en diferentes especies de vida libre (Gómez-Meda et al. 2006; Kirsch et al. 2011) tales como, peces (Cavas y Ergene 2005; Barsiene et al. 2006; Furnus 2014), mamíferos marinos como delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) (Zamora et al. 2006), y tortugas marinas (Carneiro et al. 2016; Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al. 2019).

El turismo de la Riviera Maya, en la costa de Quintana Roo, ha aumentado exponencialmente desde el año 2003 (Ruiz 2008). El crecimiento urbano y turístico constante ha generado cambios abruptos en el uso de suelo y favorecido la pérdida de hábitat de grandes áreas naturales, afectando a toda la biodiversidad de la región (Seminoff 2004; Ruiz 2008). En la península de Yucatán, se localiza la zona más importante de anidación de tortugas marinas de México, constituyendo quizás, las colonias reproductoras más grandes del mundo (Briseño 2016). De las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo, cinco de ellas, la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la caguama (*Caretta caretta*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y la tortuga 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 (Briseño 1998). Estas zonas son catalogadas como reservas naturales protegidas por lo cual son ricas en variedades de corales, peces, moluscos, manglares y pastos marinos lo que la hace ideal para el crecimiento y alimentación de esta especie de tortuga marina (DOF, 2003; DOF, 2016a). Las tortugas inmaduras de *C. mydas* permanecen en zonas neríticas donde permanecen hasta alcanzar la madurez, alimentándose principalmente de pastos marinos de las especies *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halodule* spp (Reich et al. 2007; Molina y Tussenbroek et al. 2014). En Akumal se ha registrado que pueden ser residentes del sitio por un periodo de hasta 10-16 años (Barrera- Escorcia y Namihira-Santillan 2004; Reich et al. 2007; Labrada-Martagón et al. 2017). Lo anterior, vuelve prioritaria la conservación del hábitat de la costa de Quintana Roo y por ende de la biodiversidad que contiene.

El uso de biomarcadores, permite identificar estados susceptibles de los organismos y el monitoreo de la exposición a contaminantes y de sus efectos fisiológicos o clínicos que generan en los mismos. Al trabajar con especies en riesgo de conservación, tales como las tortugas marinas, es importante validar biomarcadores útiles y económicos que garanticen su uso a largo plazo, con la finalidad de detectar manera temprana condiciones que pudieran afectar no sólo la viabilidad de las poblaciones, sino también aquellas que pudiera poner en riesgo la salud de la población humana (Labrada-Martagón 2018). Estudios previos sugieren que la técnica de MN es útil para determinar daño genético ante factores toxicológicos en tortugas marinas (Casini et al. 2018; Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al. 2019). A pesar de ser ampliamente empleada

en humanos y otros grupos animales, en tortugas marinas aún se carece de una descripción generalizada de las anomalías nucleares así como de su validación en términos toxicológicos. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue cuantificar y caracterizar morfológicamente diversas anomalías nucleares observadas en eritrocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) capturadas en vida libre en tres sitios de alimentación en la costa de Quintana Roo, México. Se presenta una primera propuesta de un índice cuantitativo, morfológico, de medición de núcleos sanos y enfermos. La información generada será útil para futuros estudios ecotoxicológicos y para el monitoreo de daño genotóxico en las poblaciones naturales de tortugas marinas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Área de estudio y captura de los ejemplares

El muestreo fue llevado a cabo en el Caribe Mexicano en las Bahías 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 (17°49' N, 89°25' W). La temperatura media anual oscila entre 25.5 grados centígrados. El tipo de clima es cálido subhúmedo y cálido húmedo. (INEGI, 2011). La península se caracteriza por presentar terrenos planos con suelos muy arcillosos y muy permeables. En la península se ha integrado una enorme red cavernosa subterránea por la que escurre el agua, en general hacia el norte (INEGI, 2011). La hidrología se caracteriza por sus aguas subterráneas, donde los flujos por escurrimiento natural total es de 4 mil hectómetros cúbicos en promedio anual (CONAGUA, 2016).

La captura de las tortugas marinas y colecta de muestras biológicas se llevó a cabo en el año 2019. El método de captura de los ejemplares varía dependiendo de las características de las bahías. En la Bahía de Akumal se realizó la captura por medio de la técnica de captura en apnea y nado libre utilizando equipo de snorkel. En Xcalak y Punta Herrero se utilizó la técnica de rodeo, que consiste en el avistamiento y persecución de ejemplares en bote hasta que después de agotado el animal, éste se captura por medio de nado libre con equipo de snorkel (Muñoz-Tenería et al. 2017; Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al. 2019).

2.2 Colecta de datos y muestras biológicas

A cada tortuga marina capturada se le tomó una muestra de sangre inmediatamente después de su captura, las muestras se tomaron del seno venoso cervical obteniendo de 2-3 mL por medio de agujas vacutainer® (21G x 1.5 in) y tubos tipo vacutainer con He/Li como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron en hielera a una temperatura aproximada de 4 - 8 °C hasta llegar al campamento, en donde se prepararon frotis sanguíneos por duplicado, los cuales fueron secados al aire, etiquetados y almacenados hasta su posterior análisis en el laboratorio (Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al., 2019). El largo curvo de caparazón (CCL) fue medido desde el punto anterior hasta la línea media (escudo nuchal) a la punta posterior de las supracaudales, y el ancho curvo de caparazón (CCW) fue medido desde el punto más ancho hasta el más cercano con la cinta métrica ($\pm 0.1\text{cm}$) (Bolten, 1999). Se pesó a los individuos por medio de una báscula manual ($\pm 0.1\text{g}$). Se registró la clase de edad, siendo clasificados como maduros aquellos organismos con una talla mayor a la edad mínima de anidación en

Quintana Roo (≥ 86 cm LCC, Zurita et al. 1993). Se realizó una inspección visual del estado físico de los individuos y se registró la presencia o ausencia de fibropapilomas de acuerdo al protocolo estandarizado para el monitoreo de dicha enfermedad (Muñoz-Tenería et al. 2017). Finalmente los especímenes fueron marcados con etiquetas Monel (National Band and Tag Company, NBTC, Newport, Kentucky, USA) colocada en el área axilar de ambas aletas anteriores de cada tortuga marina (Work y Balazs, 1999; Labrada Martagón et al. 2017) y fueron liberadas inmediatamente al terminar de registrar todos sus datos.

2.3 Tinción y cuantificación de anomalías

Los frotis sanguíneos fueron teñidos de acuerdo al protocolo específico para tortugas marinas descrito por Labrada y colaboradores (2019). Las laminillas fueron fijadas por cinco minutos en etanol (80%) y se tiñeron por cinco minutos utilizando tinción de naranja de acridina a una concentración de 0.01 g 100 mL⁻¹ en búfer de fosfato (PH 7.4). Posteriormente, se lavaron en el búfer de fosfatos por cinco 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).

Se tomaron 20 fotografías digitales de cada laminilla sanguíneas (40 por tortuga marina), utilizando un microscopio óptico vertical de fluorescencia modelo IMAGER M2, marca Zeiss, con un filtro Filter set 38 y una cámara integrada al microscopio modelo AxioCAM MRc, marca Zeiss. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 40x asegurándose de fotografiar los diferentes campos de la laminilla siguiendo un patrón en forma de zig-zag. Los hallazgos fueron fotografiados con el objetivo 100x (Labrada-Martagón et al. 2019). El conteo de células con anomalías nucleares se realizó en las fotografías usando el software Zen Pro 2012 Blue Edition (Carl Zeiss 2011), excluyendo a todas aquellas células incompletas (fuera del campo de la fotografía), o a aquellos núcleos que estuvieran sobrepuestos. La identificación de MN y buds se realizó considerando los criterios de clasificación e identificación establecidos por Thomas y colaboradores (2009) y Bolognesi y colaboradores (2013). En este estudio, se contabilizaron por vez primera otro tipo de anomalías descritas en peces, siguiendo la caracterización de Furnus y colaboradores (2014). La frecuencia de cada tipo de anomalía nuclear se presenta como número de anomalías en 2000 eritrocitos (Gómez-Meda et al. 2006; Rodríguez 2018; Labrada-Martagón et al. 2019). Las muestras en las que no se alcanzó a contabilizar el número total de eritrocitos (<2000 eritrocitos) no fueron tomadas en cuenta en las estimaciones estadísticas, pero dichas tortugas marinas (n=4) sí se incluyeron en la descripción de la población y al contabilizar la frecuencia de organismos con anomalías.

2.4 Morfología de membrana celular en anomalías nucleares.

Utilizando 15 diferentes fotografías elegidas al azar, se realizó la medición de los núcleos de todos los eritrocitos presentes en cada toma. La medición se realizó utilizando el software de procesamiento digital programado ImageJ desarrollado por National Institutes of Health (cita). A partir del análisis de imagen se obtuvo la medición del área de cada núcleo y la medición de su eje mayor. 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.

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

El índice de redondez estimado se utilizó para evaluar el cambio en la redondez del núcleo a través de las diferentes anomalías clasificadas a priori. Por tal motivo, de cada fotografía (n=15), se realizó una clasificación a priori de los núcleos usando como criterio la forma del núcleo. Nuestro criterio de clasificación consistió en cinco diferentes formas como se describe a continuación: circular (Ctrl), aquellos núcleos con una forma muy cercana a un círculo uniforme; elongado (E), aquellos núcleos con una forma ovalada uniforme; cónico (K), aquellos con una apariencia triangular o cónica; curvatura invertida (CI), todos aquellos que presentaran una especie de cavidad o invaginación; y forma indeterminada (I), núcleos cuya forma no se ajustara a ninguno de los criterios anteriores. Se descartaron aquellas células de la periferia que estuvieran incompletas y se consideró como grupo control a los núcleos circulares (Ctrl).

2.5 Metodología estadística.

Se evaluó el supuesto estadístico de normalidad por medio de la prueba de Shapiro Wilks (Zar 1996). Las variables de frecuencia de anomalías no siguieron una distribución normal ($p < 0.001$) por lo que para dichas variables se utilizaron estadísticos no paramétricos. Se estimaron estadísticos descriptivos considerando toda la muestra en conjunto y por sitios de colecta. Se utilizó una prueba de ANOVA para evaluar diferencias en la talla (CCL) de las tortugas marinas entre sitios de colecta. Se utilizó la prueba de Tukey como prueba a posteriori de comparaciones múltiples (Zar, 1996). Las diferencias en la frecuencia de anomalías nucleares entre zonas de alimentación se evaluaron por medio de pruebas de Kruskal Wallis. Previo a este análisis, se realizaron pruebas de Grubbs para la identificación de datos extremos; se eliminaron tres datos de la variable MN (n=2 Xcalak, n=1 Punta Herrero), un dato de la variable buds (n=1 Punta Herrero) y tres datos, uno de cada zona, de la variable frecuencia de anomalías. Se generaron histogramas de frecuencia de organismos agrupados por clases del número de anomalías en 2000 eritrocitos por sitio de estudio. Se evaluaron diferencias de dichas distribuciones para cada variable por separado (MN, buds, anomalías), por medio de una prueba no paramétrica de Kolmogorov Smirnov para la comparación de dos muestras (Young et al. 1977). Se evaluó si existe una correlación entre la talla de los individuos (LCC) y el número de anomalías nucleares, así como correlaciones entre tipos de anomalías (MN, buds, otras), por medio de correlaciones de Spearman, considerando a todos los datos en conjunto y separando los datos por sitios de captura (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 (Ctrl, E, K, CI, I), considerando como factor fijo el sitio de colecta y como medida repetida la laminilla sanguínea (cita). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con *statistica v.7* (StatSoft, Inc. 2004), *Past v3.23* (Hammer et al., 2001) y *R v.3.1.3* (R Core Team, 2016), usando un límite de confianza de $\alpha < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Estructura poblacional y anomalías nucleares

El total de tortugas verdes capturadas durante en el año 2019 (26 agosto - 1 septiembre) fueron 34 individuos. La talla promedio de las tortugas verdes agrupadas por zona de captura se presenta en la tabla 1. Las tortugas de Punta Herrero fueron significativamente más pequeñas que las capturadas en Akumal y Xcalak ($F_{(2,31)}=6.16$, $p=0.005$). Todos los especímenes capturados fueron tortugas verdes inmaduras de sexo indeterminado (<86 cm LCC). El 50% ($n=3$) de la tortugas capturada en Akumal presentaron tumores externos, evidencia de fibropapilomatosis y, solamente un individuo de Xcalak (9%) presentó un papiloma en ojo de tamaño menor a 1 mm.

En este estudio se reportan por vez primera, en *C. mydas*, las anomalías nucleares de tipo bebbled, lobed, notched and eightshape (Fig. 1). La descripción de los criterios de clasificación de las mismas, empleadas en este estudio, se encuentran en la Tabla 2. La frecuencia de MN, buds y el resto de anomalías nucleares cuantificadas en las tortugas verdes de este estudio se presentan en la tabla 3 agrupadas por zona de estudio. Al realizar los conteos se encontraron 4 muestras ($n=2$ Xcalak, $n=1$ Punta Herrero, $n=1$ Akumal) en las que no se alcanzaron a contar 2000 eritrocitos en las fotografías, por lo cual, los estadísticos se estimaron a partir de los datos de 30 organismos capturados.

El 50% de las tortugas verdes capturadas para este estudio presentaron MN. El resto de las anomalías nucleares (bebbled, lobed, notched and eightshape) incluidos los buds se observaron en al menos el 90% de individuos de los que se obtuvo muestra ($n=30$). De manera general, la población de estudio presentó un valor de mediana de 0.5 MN 2000 eritrocitos-1, 35.5 buds 2000 eritrocitos-1 y 12.5 anomalías 2000 eritrocitos-1 (no buds). Como datos extremos ($p \leq 0.001$) se observaron, 11 y 20 MN 2000 eritrocitos-1 en dos tortugas verdes capturadas en Xcalak; 15 MN 2000 eritrocitos-1 en un individuo de Punta Herrero; 127 buds 2000 eritrocitos-1 en una tortuga de Punta Herrero; y finalmente 140, 219 y 297 anomalías 2000 eritrocitos-1 en una tortuga de Akumal, Xcalak y Punta Herrero, respectivamente (Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas en los patrones de distribución de la frecuencia de organismos afectados (Fig. 3). La distribución de tortugas marinas de Akumal afectadas con MN fue distinta a la observada en Punta Herrero ($D_{(0.05,33)}=0.256$, $p < 0.02$) y la distribución de la frecuencia de organismos de Akumal afectados con buds fue distinta a la observada en Punta Herrero ($D_{(0.05,33)}=0.31$, $p < 0.01$) y Xcalak ($D_{(0.05,33)}=0.45$, $p < 0.01$), siendo éstos dos últimos sitios donde se encontró una mayor frecuencia de individuos en los valores más altos que el número de MN y buds cuantificados en 2000 eritrocitos (Fig. 3).

Sin considerar los datos extremos descritos con anterioridad, al comparar las medianas no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de MN ($H_{(2,27)}=2.98$, $p=0.22$), buds ($H_{(2,29)}=2.66$, $p=0.26$) o anomalías nucleares ($H_{(2,27)}=3.13$, $p=0.21$) entre las zonas de estudio. Las variables no presentaron una correlación con la talla de las tortugas verdes (LCC) cuando se evaluaron por separado o en conjunto los tres sitios de estudio. La frecuencia de buds, se correlacionó significativamente con la frecuencia de otras anomalías (bebbled, lobed, notched and eightshape en conjunto) (Spearman's $r=0.85$, $p < 0.001$). La frecuencia de MN no presentó asociación con los buds u otras anomalías.

La frecuencia de tortugas verdes capturadas por clases de talla (29.5 - 71.8 cm LCC) y estado reproductivo (100% inmaduros) coincide con lo reportado para la costa de Quintana Roo, en donde estas bahías se identifican como sitios de forrajeo de la especie, relevantes para el crecimiento y desarrollo de individuos inmaduros de tortuga verde (Labrada-Martagón et al. 2017). En esta región los organismos subadultos y adultos se encuentran preferentemente en áreas abiertas, retiradas de la costa y con mayor profundidad (Muñoz et al. 2016), al igual que lo reportado en la población de la misma especie que habita en el Pacífico Oriental Mexicano (López-Mendilaharsu et al. 2002).

La talla de las tortugas verdes capturadas en el año 2019 no estuvo asociado a la frecuencia de anomalías cuantificada. Esto coincide con observaciones previas realizadas en la misma región (Rodríguez, 2018), contrario a lo reportado en tortugas verdes de la costa de Brasil. Carneiro y colaboradores (2016) han reportado resultados significativos en cuanto a la correlación entre la talla de las tortugas verdes y la frecuencia de células micronucleadas. Las diferencias entre poblaciones pueden estar relacionadas a la prevalencia de fibropapilomatosis reportada en cada estudio; en el estudio de Brasil los autores reportan que el 52% (n= 14) de los especímenes estaban afectados con fibropapilomatosis. En el presente trabajo únicamente el 14% (n=5) de los individuos sugerían presencia de fibropapilomas. Lo anterior podría estar relacionado a que los individuos podrían estar en alguna fase incipiente de la enfermedad; además, todos los especímenes en el presente estudio fueron juveniles. En la costa de Quintana Roo, tampoco se han reportado diferencias en la frecuencia de anomalías entre clases de edad (inmaduras y adultas, Rodríguez 2018; factor que no pudo ser evaluado en este trabajo).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que hay una mayor frecuencia de tortugas verdes con elevada frecuencia de anomalías nucleares en eritrocitos en la región sur de la costa de Quintana Roo, específicamente en las bahías de Xcalak y Punta Herrero. 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 agua, plasma y sangre, respectivamente, de tortuga verde fue mayor en Punta Herrero y Xcalak (Sanjuan 2020). Dichas bahías no son los más turísticos de Quintana Roo, sin embargo, Punta Herrero está siendo afectada por el arrastre de sustancias químicas resultado de actividades agropecuarias (Bauer-Gottwein et al. 2011). A su vez, Xcalak recibe constante contaminación que proviene del Río 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 como las bahías de Mahahual y Akumal, que se consideraban más contaminadas (Fernández et al. 2007).

A pesar de no haberse detectado diferencias estadísticamente significativas, es evidente que las tortugas de Akumal presentan mayor variabilidad en la frecuencia de MN, en comparación con lo observado en los otros dos sitios. Esta gran variabilidad podría ser reflejo del pequeño tamaño de muestra obtenido (n=6). Sin embargo, Akumal es la bahía

en donde se ha reportado mayor variabilidad en las respuestas de las defensas antioxidantes y daño por estrés oxidativo (Islas, 2020). Así mismo, es la bahía con mayor prevalencia de fibropapilomatosis de la población de tortugas verdes del estado de Quintana Roo (Muñoz et al. 2016), prevalencia que ha ido en aumento en los últimos 10 años (Muñoz et al. 2016). 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 condiciones ambientales, tales como pérdida de pastos marinos (Molina y Tussenbroek et al. 2014), descarga de drenajes y por ende presencia de coliformes fecales (Barrera-Escorcia y Namihira-Santillán 2004), y eutrofización (mayores señales isotópicas) (Baker et al. 2010) consideradas como factores que favorecen el desarrollo de enfermedades en tortugas marinas tales como, la fibropapilomatosis (Baker et al. 2010). Actividades recreativas como el avistamiento de anidación, alimentación de los especímenes, nado con tortugas marinas con guías turísticos en zonas poco profundas han llevado a una interrupción del ecosistema natural de las tortugas así como a alterar su comportamiento (Slater, 2014; DOF, 2016a). Las actividades turísticas y la presencia de nadadores en la bahía de Akumal generan además, contaminación marina por uso de bloqueadores, presencia de embarcaciones, incidencia de aguas residuales de la población urbana, entre otras fuentes de perturbación (SEMARNAT 2007, CONANP 2016).

Este estudio confirma que los sitios con mayor afluencia turística como Akumal siguen siendo 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. Xcalak y Punta Herrero no son los más turísticos de Quintana Roo y a pesar de ser reservas naturales protegidas están siendo más afectados por el arrastre químico de sustancias resultado de actividades agropecuarias y contaminación del Caribe Central confirmando 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.

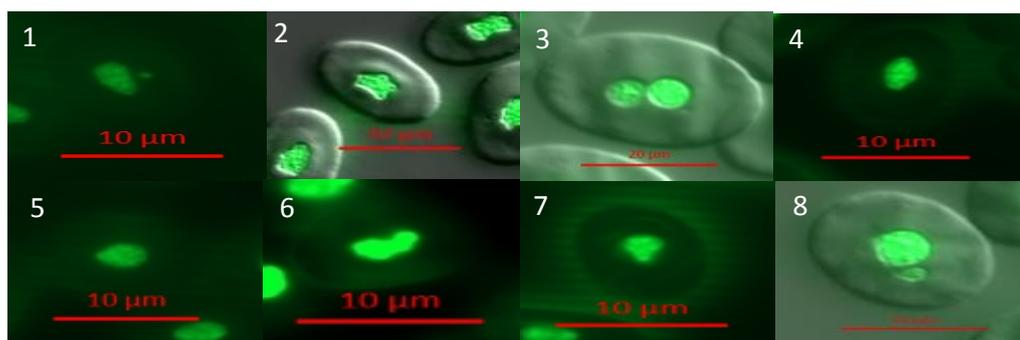


Figura 1. Anormalidades identificadas en sangre periférica de tortuga verde (*C. mydas*) de la costa de Quintana Roo. 1) Micronúcleo (40x); 2) núcleo lobulado (40x); 3) célula binucleada (100x); 4) núcleo ampollado (40x); 5) Brote nuclear (40x); 6) núcleo con muesca (40x); 7) núcleo en forma de ocho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

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

	n	Mean ± Std.Dev	Range	Median	P10	P90	p
Xcalak	13	56.97 ± 9.6	33.5 – 66.2	58.00	47.2	66.1	0.04
Punta Herrero	14	46.06 ± 9.9	29.5 – 57.9	47.05	31.7	57.9	
Akumal	7	59.04 ± 8.9	47.2 – 71.8	58.80	47.2	71.8	

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

Tabla 2. Descripción de los criterios usados en este estudio para identificar las anomalías nucleares en Tortuga verde (*C. mydas*) de Quintana Roo.

Type	Description	Reference
Bebbled nucleus	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 bien definida hasta una estructura totalmente circunscrita, estas se consideran precursores de MN.	Carrasco et al., 1990; Shimizu et al. 1998
Lobed nucleus	Es un núcleo con evaginaciones más largas que un núcleo con ampolla, también se diferencia en que pueden presentar varias prolongaciones, puede verse como una forma estrellada o sin forma predeterminada en algunos casos.	Carrasco et al. 1990
Notched nucleus	Un "notch" se define como un corte que genera una muesca típicamente situada en el centro del núcleo, no teniendo un tamaño definido pero casi siempre siendo similar al tamaño de una vacuola.	Carrasco et al. 1990
Eightshape nucleus	Es simplemente cuando el núcleo presentan una constricción que adquiere una forma de ocho.	Furnus et al. 2014
Buds	El núcleo presenta constricciones que son sugestivas a un proceso de eliminación de material genético, se diferencian en que	Bolognesi et al. 2013

	estas prolongaciones están unidas al núcleo por un puente nucleoplasmático por lo cual se denotan siempre un poco separados del núcleo.	
Micronucleus	Un MN tiene la forma redonda o almendrada y mide entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, presenta la misma intensidad textura y coloración de tinción que el núcleo, y no está conectado a él.	Tolbert et al. 1991

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos (MN), buds y anomalías nucleares (AN) en sangre periférica of de tortugas verdes (*C. mydas*) de Quinta Roo, agrupadas por sitios de estudio.

Zona	Variable	n	Mean ± Std.Dev	Rango	Median	P10-P90
	MN	11	3.27 ± 6.40	0 – 20	1	0 – 11
Xcalak	Buds	11	56.27 ± 41.26	0 – 132	40	20 – 113
	AN	11	43.55 ± 63.36	0 – 219	22	7 – 91
	MN	13	1.69 ± 4.11	0 – 15	0	0 – 2.8
Punta Herrero	Buds	13	41.00 ± 30.34	16 – 127	29	18.2 – 66.2
	AN	13	37.46 ± 79.53	1 – 297	12	5 – 54.6
	MN	6	2.83 ± 3.37	0 – 8	1.5	0 – 7
Akumal	Buds	6	24.67 ± 18.33	0 – 41	33	1.5 – 39.5
	AN	6	30.33 ± 54.50	0 – 140	8.5	0 – 82.5

Abreviaciones: Std.Dev, desviación estándar; P10, percentil 10%; P90, percentil 90%.

3.2 Índice de morfología celular nuclear.

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 ($F_{(4,24)}=15.75$; $p<0.001$) (Fig. 2). Las células circulares son significativamente más redondas que las elongadas, cónicas, indeterminadas y con curvatura invertida ($p\leq 0.001$). 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. 2).

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. 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.

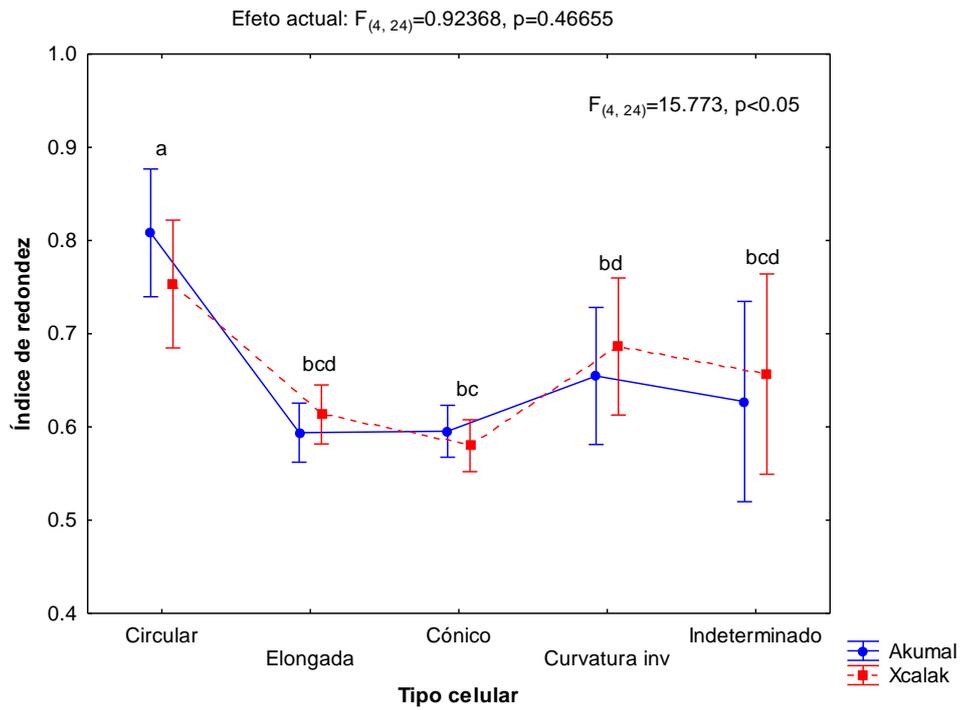


Figura 2. Índice de redondez en eritrocitos de tortuga verde (*C. mydas*) de dos zonas de estudio en Quintana Roo. Las letras distintas denotan los tipos celulares significativamente diferentes ($p<0.05$) según Tukey. Las barras verticales representan el 95% de confianza.

4. CONCLUSIONES.

Este estudio confirma que los sitios con mayor afluencia turística como Akumal siguen siendo 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. Xcalak y Punta Herrero no son los más turísticos de Quintana Roo y a pesar de ser reservas naturales protegidas están siendo más afectados por el arrastre químico de sustancias resultado de actividades agropecuarias y contaminación del Caribe Central confirmando 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.

El ensayo de MN en este estudio 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; por otro lado el índice de redondez utilizado no resultó útil para diferenciar entre eritrocitos sanos y aquellos con anomalías en su núcleo.

5. RECOMENDACIONES.

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 afectan el ecosistema y la vida marina de Quintana Roo e 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.

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.

6. BIBLIOGRAFÍA

Baker, D.M., Jordán-Dahlgren, E., Maldonado, M. A y 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-Escorcia, 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.

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.

Bolten, A.B. 1999. Techniques for measuring sea turtles. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*.4: 1-5. Consultado en línea el 2 de marzo del 2022. Disponible en línea en https://accstr.ufl.edu/files/Bolten_Tech_Man_1999.pdf.

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.

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.

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

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.

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

Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2016. Atlas del Agua en México 2016.

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

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.

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 Pollution Bulletin*, 54(11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.08.007>.

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.

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.

Hammer, O, Harper, D. A. T. and Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* (4)1:9 pp.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2011. Estadísticas Quintana Roo. <http://mapserver.inegi.org.mx/geografía/español/estados>.

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.

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.

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

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; Ramirez 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.

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

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.

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

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>.

Reich, K. J., Bjorndal, K. A., & Bolten, A. B. 2007. The “lost years” of green turtles: Using stable isotopes to study cryptic lifestages. Biology Letters, 3(6), 712–714. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0394>

R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rodríguez Salazar, CL. 2018. Caracterización de la frecuencia de anormalidades 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.

Secretaría 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.

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 mangle: *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.

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

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.

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.

StatSoft, Inc., 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com 2004.

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>.

Work, T.M; Balazs G.H. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J.Wildl.Dis.* 35:804–80.

Young, RK; Rodríguez de Arizmendi, G. 1977. Introducción a la estadística aplicada a las ciencias de la conducta. 584 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 bottle nose dolphin (*Tursiops truncatus*) to marine toxicology studies. *Acta BiolHung.* 57(4):441-8.

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

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.

7. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y A la Universidad de El Salvador (UES) por permitir la colaboración y expandir los conocimientos sobre vida silvestre en nuestro país El Salvador.