



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

CHROMOSOMES, DNA LESION AND NUCLEAR MALFORMATION IN THE FRESHWATER TURTLE *KINOSTERNON LEUCOSTOMUM* (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE)

CROMOSOMAS, LESIÓN DEL ADN Y MALFORMACIÓN NUCLEAR EN LA TORTUGA DULCEACUÍCOLA *KINOSTERNON LEUCOSTOMUM* (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE)

Javier Hernández-Guzmán¹; Alfredo Arias Trinidad¹; Raúl E. Islas-Jesús¹; Azucena Fraire-Vázquez¹; R. Isela De la cruz-Izquierdo¹; Nancy C. García-Guzmán² & Xiutlhalzin Ruiz¹

¹Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco, carretera vecinal Comalcalco-Paraíso Km 2.0, Ra. Occidente 3ra. Sección, C.P. 86650. Comalcalco, Tabasco, México. Correo electrónico: jhernandez-guzman@hotmail.com

²Universidad Politécnica del Centro, carretera federal Villahermosa-Teapa Km 22.5, Tumbulushal, C.P. 86290, Centro, Tabasco, México.

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 201-211.

ABSTRACT

Kinosternon leucostomum is one of the common freshwater turtles in Tabasco State, Mexico. However, studies of this species are limited for this region. The pollution in aquatic ecosystems from Tabasco is increasing and the effects on wildlife have not been properly made. Therefore, a chromosomic study and DNA lesion and nuclear malformation was performed in *K. leucostomum* from Tabasco. The karyotype in the turtle *K. leucostomum* is 34 msm/A + 22 T/C ($2n=56$ chromosomes). Also, intracellular malformations were identified: Chromosomes and DNA damage (micronucleus), binucleated cells, trinucleated cells, tetranucleated cells, cells in apoptosis and nucleoplasmic bridge, in irregular proportions. The probable origin of cell disorders is due to the presence of contaminants in aquatic ecosystems from Tabasco.

Key words: cells, chromosome, *Kinosternon leucostomum*, micronucleus, turtle.

RESUMEN

La especie *Kinosternon leucostomum*, es una de las tortugas dulceacuícolas comunes del estado de Tabasco, México. Sin embargo, los estudios en esta especie son escasos para esta región. La contaminación en los ecosistemas acuáticos de Tabasco están aumentando cada vez más, y los efectos a la fauna silvestre no se han realizado adecuadamente. Por ello, se realizó un estudio cromosómico, de lesión de ADN y malformación nuclear en la especie *K. leucostomum* de Tabasco. El cariotipo en la tortuga *K. leucostomum* fue 34 msm/A + 22 T/C ($2n=56$ cromosomas). También, se identificaron malformaciones intracelulares: lesión del ADN y cromosomas (micronúcleos), células binucleadas, células trinucleadas, células tetranucleadas, células en apoptosis y puentes nucleoplásmicos, en proporciones irregulares. El origen probable de las alteraciones celulares es debido a la presencia de contaminantes en los ecosistemas acuáticos de Tabasco.

Palabras clave: células, cromosoma, *Kinosternon leucostomum*, micronúcleos, tortuga.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Tabasco, sur de México, así como en el norte de México, se han realizado diversas investigaciones en la que se ha comprobado la existencia de modificación de la interacción ecológica por actividades antropogénicas y contaminantes tóxicos (García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza 2012, Hernández-Acosta *et al.* 2013, Pérez *et al.* 2013) así como estudios que demuestran la alteración genética a través de los análisis de los cromosomas, presentándose ocurrencias de anfibios triploides (Hernández-Guzmán 2009), diferenciación cariomórfica de peces (Arias-Rodríguez *et al.* 2008, Bucio-Luna 2015), anfibios y reptiles (Hernández-Guzmán *et al.* 2011, Hernández-Guzmán *et al.* 2014, Hernández-Guzmán & Islas Jesús, 2014) solo en la región del sureste mexicano.

La existencia de contaminantes tóxicos en los ecosistemas acuáticos en el estado de Tabasco es innegable, existiendo pruebas de tal hecho desde 1983 y más reciente en la fauna silvestre nativa (Rosas *et al.* 1983). La acción negativa de los metales pesados divalentes sobre el metabolismo es ocasionada al menos por dos vías, transporte medio-ambiente disperso en el aire, agua, polvo y alimento; la segunda, por alterar la forma bioquímica de los elementos. La habilidad de la vida silvestre para acumular y concentrar metales pesados tales como el cadmio y otros metales divalentes, incrementan el riesgo de toxicidad sobre la cadena alimenticia, siendo la dieta una de las principales vías de exposición a metales (Nava-Ruíz & Méndez-Armenta 2011). Hipotéticamente se cree que las malformaciones intracelulares se inician en la membrana plasmática, ya que es considerada como la primera estructura viva que es afectada por la toxicidad de los metales. El daño en las membranas por los metales, puede consistir en cambios en la composición y estabilidad de los lípidos de la membrana,

oxidación e inhibición de proteínas esenciales por la interacción con sus grupos tioles, y posteriormente alterar los procesos metabólicos en el citosol, por lo que después de la exposición a estos contaminantes, la morfología interna y externa de la célula puede cambiar (Meharg 1993, Hernández & Cooke 1997, Banfalvi 2011).

Por otro lado, los análisis citogenéticos en la región aún son insuficientes con relación a la biodiversidad que alberga, mientras que los estudios de micronúcleos y alteraciones celulares no tienen precedentes (Hernández-Guzmán *et al.* 2014, Hernández-Guzmán & Islas-Jesús 2014). Esto, ha despertado el interés de investigaciones en el estado de Tabasco, México, ya que el número de alteración o modificación en la sanidad del ambiente y de la biodiversidad ha sido perturbado por los contaminantes presentes en los diversos ecosistemas (Díaz-González *et al.* 1994, Ramos-Herrera *et al.* 2012).

Por lo anterior, el presente estudio fue realizado con la finalidad de identificar cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear a través del cariotipo en la tortuga dulceacuícola *Kinosternon leucostomum* (Duméril, Bibron & Duméril 1851). Esta especie se distribuye en todo el estado de Tabasco, México y es considerada como una de las tortugas dulceacuícolas de mayor importancia cultural y gastronómica para el estado de Tabasco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de colecta

Se recolectaron seis especímenes de la tortuga dulceacuícola *K. leucostomum* en dos ecosistemas acuáticos; tres (una hembra y dos machos) en el río Seco con coordenadas 18°15'57.57" N y 93°13'16.40" O y tres hembras de una laguna permanente con

coordenadas 18°17'01.95'' N y 93°13'00.29'' O, en el municipio de Comalcalco, Estado de Tabasco, México, los cuales fueron trasladados a laboratorio para realizar el procedimiento citogenético y método squash para la observación de los cromosomas, núcleos y micronúcleos.

Técnica citogenética y squash

Se efectuó una biopsia abierta a los especímenes para extraer muestras de sangre y tejido de órganos blancos (riñón y páncreas), con los cuales se prepararon squash (frotis de tejido hematopoyético) y los órganos blancos fueron disgregados en tubos de ensayo de 14 mL que contenían 5 mL de solución hipotónica al 1,0%, dejando a exposición durante 10 min; posteriormente se agregó 2 mL de fijador en proporción 4:1 (metanol, ácido acético) haciendo tres recambios de fijador, centrifugando las muestras a 7000 rpm durante 10 min; seguidamente, se extrajo 1,5 mL del tejido disgregado y previamente fijado en microtubos de 2,0 mL. Después, se gotearon 42 muestras de tejido hematopoyético y tejido blanco (21:21 respectivamente) y se tiñeron con colorante biológico Giemsa al 10% en buffer de fosfatos con pH de 7,0 (Kligerman & Bloom 1977). El procedimiento fue basado en modificaciones a la técnica citogenética de Hernández-Guzmán *et al.* (2014) para tortugas y empleando los parámetros citogenéticos para la clasificación cromosómica de Levan *et al.* (1964) y Bickham (1975).

Análisis microscópico

La búsqueda de las dispersiones se realizaron con objetivos de 40X y se tomaron fotografías con cámara digital utilizando el objetivo de 100X. Posteriormente se empleó el software MicroMeasure 3.3 (Reeves 2001), para hacer las medidas en μm de los cromosomas, núcleos y micronúcleos.

Procedimiento estadístico

Se llevó a cabo un análisis multivariado: Para el cual se utilizó la propuesta elaborada por

Sokal & Sneath (1963) citado en Franco-Navia *et al.* (2010), que consistió en la elaboración de una Matriz de similitud con medidas euclidianas y un análisis clúster para la medición de distancias citogenéticas con otros estudios en tortugas realizado con el software PAST 2.01 (Hammer *et al.* 2001), con la finalidad de obtener la comparación cariomórfica con especies de la subfamilia Kinosterninae. Además, se realizó un análisis de varianza de una vía con la prueba de Tukey ($p=0,05$) para el análisis del nivel de significancia de los datos obtenidos entre complementos cromosómicos.

El conteo de micronúcleos en eritrocitos fue expresado en porcentaje y utilizando los criterios de Prieto *et al.* (2008) para organismos acuáticos:

$$\text{Mnc} = \frac{\text{ncMn}}{N} \times 100$$

Donde ncMn = número de células con micronúcleo, N=número total de células analizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 256 preparaciones cromosómicas de las 46 muestras elaboradas, de las cuales el 68% correspondió a células con $2n=56$ cromosomas, mientras que el restante 32% se dispersaron en números cromosómicos debajo y encima de los 56 cromosomas caracterizados para *K. leucostomum*. El tamaño de los cromosomas de la tortuga pochitoque, presentaron sus primeros pares de tipo birrámeo, $2,48 \pm 0,26 \mu\text{m}$ de brazo corto y $3,85 \pm 0,29 \mu\text{m}$ de brazo largo, mientras que en sus últimos pares cromosómicos presentaron $0,89 \pm 0,16 \mu\text{m}$ de brazo corto y $2,22 \pm 0,22 \mu\text{m}$ de brazo largo; por otro lado, las medidas de los cromosomas tipo monorrámeo en sus primeros pares correspondieron a $3,36 \pm 0,15 \mu\text{m}$ y en sus últimos pares cromosómicos a $1,63 \pm 0,12 \mu\text{m}$. La clasificación cromosómica de acuerdo con

Levan *et al.* (1964) fue 34 msm + 22 T, mientras que la clasificación de acuerdo con Bickham (1975) fue 34 A + 22 C (Tabla 1, Figura 1).

De las 126 muestras preparadas por el método de squash con tejido y sangre periférica de *K. leucostomum*, se identificó que los especímenes de Río seco, presentaron anomalías celulares, de las cuales, 113 células (15%) obtuvieron la presencia de micronúcleos, de los cuales 92 células (11% del total analizadas) presentaron un micronúcleo en su estructura intracelular, mientras que 16 células (2% del total analizadas) presentaron dos micronúcleos en su estructura intracelular y cinco células (1% del total analizadas) presentaron tres micronúcleos en su estructura interna. Además, 15 células se caracterizaron por la presencia de binúcleos (2% del total de células analizadas), mientras que el resto de las células (696=84%) de 824 contabilizadas, se consideraron morfológicamente sanas. También, fue posible identificar la presencia de puentes nucleoplásmicos a nivel nuclear y a nivel micronuclear, alteraciones totales al ADN que se manifestaron en núcleos y cromosomas fragmentados, parcial o totalmente destruidos, aunado con las porciones de ADN con morfología de micronúcleo (Figura 2).

En el estudio citogenético de *K. leucostomum* de los ecosistemas acuáticos de Comalcalco, Tabasco, México se ratificó el número modal en condición diploide $2n=56$ cromosomas, el cual había sido descrito por Hernández-Guzmán *et al.* (2014), para organismos de municipios de Cárdenas y Centro (Tabasco, México). A pesar de que las poblaciones de tortugas de la especie *K. leucostomum* son geográficamente cercanas, los especímenes de Comalcalco presentaron variación en la morfología de los cromosomas, los cuales se evidencian en el número de cromosomas tipo metacéntrico-submetacéntrico “msm”, 34 en

especímenes de Comalcalco y 12 en especímenes de Cárdenas y Centro; estas variaciones también se reflejan en el número de cromosomas tipo subtelocéntrico-telocéntrico “stt”, los cuales son inexistentes en los especímenes de *K. leucostomum* de Comalcalco, mientras que en los especímenes de Cárdenas y Centro se identifican 22 cromosomas. La similitud entre estas poblaciones, se restringe desde el punto de vista citogenético, en los cromosomas tipo Telocéntrico “T” ya que en todas las poblaciones de *K. leucostomum* se identifican 22 cromosomas tipo “T”. El estudio previo de Hernández-Guzmán *et al.* (2014) en la especie *K. leucostomum*, es el único antecedente con el cual se puede llevar a cabo una comparación citogenética de acuerdo con los parámetros de Levan *et al.* (1964) directamente con la especie con distribución en Tabasco, México, ya que por la complejidad de la investigación cromosómica en las tortugas y debido a que los organismos presentan cromosomas difíciles de observar y de medir, las investigaciones previas en estos reptiles clasifican a los cromosomas a través de los parámetros de Bickham (1975), el cual es una clasificación más generalista. De acuerdo con estos parámetros, la clasificación cromosómica de *K. leucostomum* de Comalcalco corresponde a 34 A + 22 C y los especímenes de Cárdenas y Centro con 12 A + 22 B + 22 C. El análisis de varianza de una vía entre los cromosomas de *K. leucostomum* de origen de Comalcalco, Tabasco, México con los de origen de Cárdenas y Centro, Tabasco, México, no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey ($p=0,05$). En otro contexto, la comparación del presente estudio con otras investigaciones en especies de la subfamilia Kinosterninae, la tortuga *K. leucostomum* presenta el mismo número de cromosomas diploides $2n=56$, compartiendo esta característica con *K. l. postinguinale* (Cope 1887) de acuerdo con Killebrew (1975), *K. flavescens* (Agassiz 1857) de acuerdo con Stock (1972) & Killebrew (1975), *K.*

subrubrum (Bonnaterre 1789) de acuerdo con Stock (1972) & Gorman (1973), *K. s. hippocrepis* (Gray 1855) de acuerdo con Killebrew (1975), *K. s. steindachneri* (Siebenrock 1906) según Killebrew (1975) & Sites *et al.* (1979), *K. hirtipes* (Stejneger 1925) de acuerdo con Killebrew (1975), sin embargo, existen reportes aislados en la que especies de este grupo de tortugas presentan $2n=54$ cromosomas como en *K. subrubrum* (Forbes 1966) y $2n=50$ cromosomas en *Sternotherus*

odoratus (Latreille 1801) en acuerdo con Risley (1936); no obstante, la estadística de estos primeros registros pueden atribuirse a la técnica de la época y a la información inexistente en este grupo de tortugas. De acuerdo con el análisis clúster citogenético de las especies que se ubican en el grupo Kinosterninae, se describen tres grupos principales: grupo A, caracterizado por especies que presentan nivel diploide de $2n=56$ cromosomas con $1n=28$ cromosomas; el grupo

Tabla 1. Medidas en micrómetros de los cromosomas de *Kinosternon leucostomum* con $2n=56$ cromosomas.

N	Brazo largo	Brazo		r	i	d	Clasificación
		Corto					
1	3,85±0,29	2,48±0,26		1,55	39,16	2,17	msm/A
2	3,30±0,10	1,96±0,19		1,68	37,28	2,54	msm/A
3	2,75±0,26	1,85±0,19		1,48	40,30	1,94	msm/A
4	3,09±0,17	1,71±0,21		1,81	35,58	2,88	msm/A
5	2,85±0,18	1,64±0,24		1,73	36,58	2,68	msm/A
6	3,00±0,50	1,59±0,24		1,89	34,59	3,08	msm/A
7	3,06±0,14	1,49±0,28		2,05	32,77	3,45	msm/A
8	3,04±0,29	1,41±0,28		2,15	31,75	3,65	msm/A
9	3,02±0,34	1,38±0,26		2,18	31,45	3,71	msm/A
10	2,75±0,39	1,32±0,29		2,08	32,50	3,50	msm/A
11	2,70±0,17	1,26±0,33		2,14	31,86	3,63	msm/A
12	2,62±0,09	1,22±0,30		2,14	31,82	3,64	msm/A
13	2,85±0,34	1,16±0,28		2,46	28,86	4,23	msm/A
14	2,46±0,13	1,11±0,28		2,21	31,14	3,77	msm/A
15	2,25±0,03	1,05±0,27		2,14	31,80	3,64	msm/A
16	2,38±0,16	0,97±0,23		2,45	28,96	4,21	msm/A
17	2,22±0,22	0,89±0,16		2,50	28,54	4,29	msm/A
18	3,36±0,15	0,00	-	0,00	10,00		T/C
19	2,98±0,07	0,00	-	0,00	10,00		T/C
20	2,86±0,07	0,00	-	0,00	10,00		T/C
21	2,77±0,13	0,00	-	0,00	10,00		T/C
22	2,61±0,17	0,00	-	0,00	10,00		T/C
23	2,46±0,08	0,00	-	0,00	10,00		T/C
24	2,30±0,01	0,00	-	0,00	10,00		T/C
25	2,23±0,03	0,00	-	0,00	10,00		T/C
26	2,13±0,06	0,00	-	0,00	10,00		T/C
27	1,86±0,12	0,00	-	0,00	10,00		T/C
28	1,63±0,12	0,00	-	0,00	10,00		T/C

N= par cromosómico, r= proporción de brazos ($r=q/p$), i= índice centromérico ($i=(100*p)/(p+q)$), d= diferencia entre brazos ($d=(r-1)*10/(r+1)$).

B, con nivel diploide de $2n=54$ cromosomas y $1n=27$; el grupo C, con nivel diploide de $2n=50$ cromosomas y $1n=25$ (Figura 3).

Por otro lado, el daño del ADN que se manifiesta por la presencia de micronúcleos espontáneos, morfología atípica de los cromosomas y núcleos con distintos grados de fragmentación puede tener diferentes orígenes, desde material particulado en suspensión (PM10), es decir, por

contaminación atmosférica de acuerdo con Anze *et al.* (2007) y García-Ferreira & Carreras-Arancibia (2008), por presencia de metales pesados como el cromo VI (Prieto *et al.* 2008) y otros metales divalentes como el Cd y Pb (Sabath & Robles-Osorio 2012), por herbicidas como el glifosato de acuerdo con Mañas-Torres *et al.* (2006), por hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como el fenantreno, Corredor-Santamaría *et al.* (2012) o por actividades antropogénicas en zonas

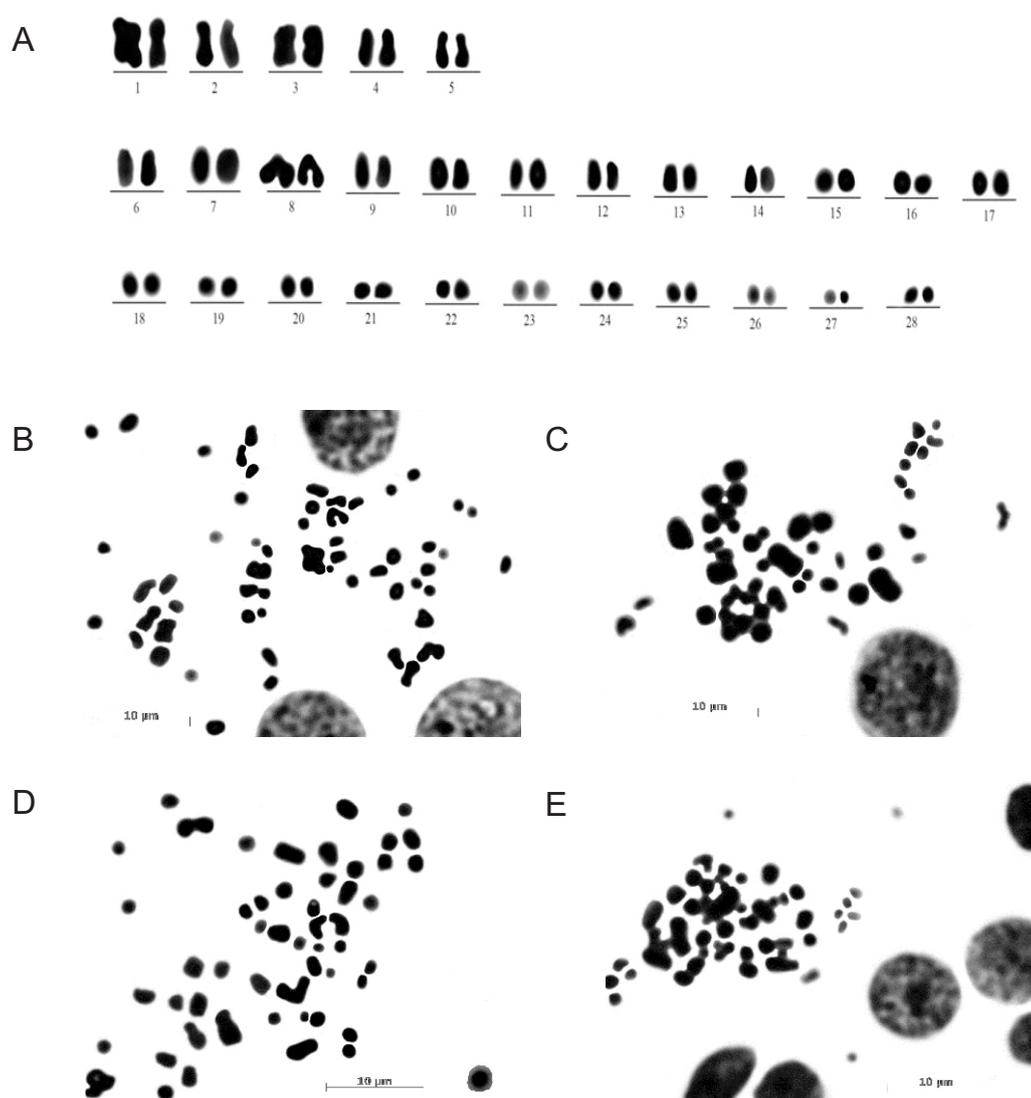


Figura 1. Cariotipo de *Kinosternon leucostomum* $2n=56$ (A), dispersiones cromosómicas de organismos hembras (B y C), dispersiones cromosómicas de organismos machos (D y E).

urbanas (Sotil *et al.* 2007, Pollo *et al.* 2012, Carraffa *et al.* 2013); por lo tanto, los causantes de las malformaciones intracelulares en *K. leucostomum* de Comalcalco, Tabasco, México podría deberse a diversos agentes genotóxicos y no solo a uno, esto considerando, que el municipio de Comalcalco y el estado de Tabasco son productores y exportadores de hidrocarburos y de que existen registros de la presencia de metales pesados en

los ecosistemas acuáticos y en fauna silvestre de la capital del estado (Villahermosa, Tabasco) de acuerdo con Rosas *et al.* (1983) y Gamboa *et al.* (2009). Por otro lado, el registro de anomalías intracelulares en *K. leucostomum* del presente documento se suma a la investigación de Hernández-Guzmán *et al.* (2014) en la misma especie, donde se descubrieron la presencia de microcromosomas “B”.

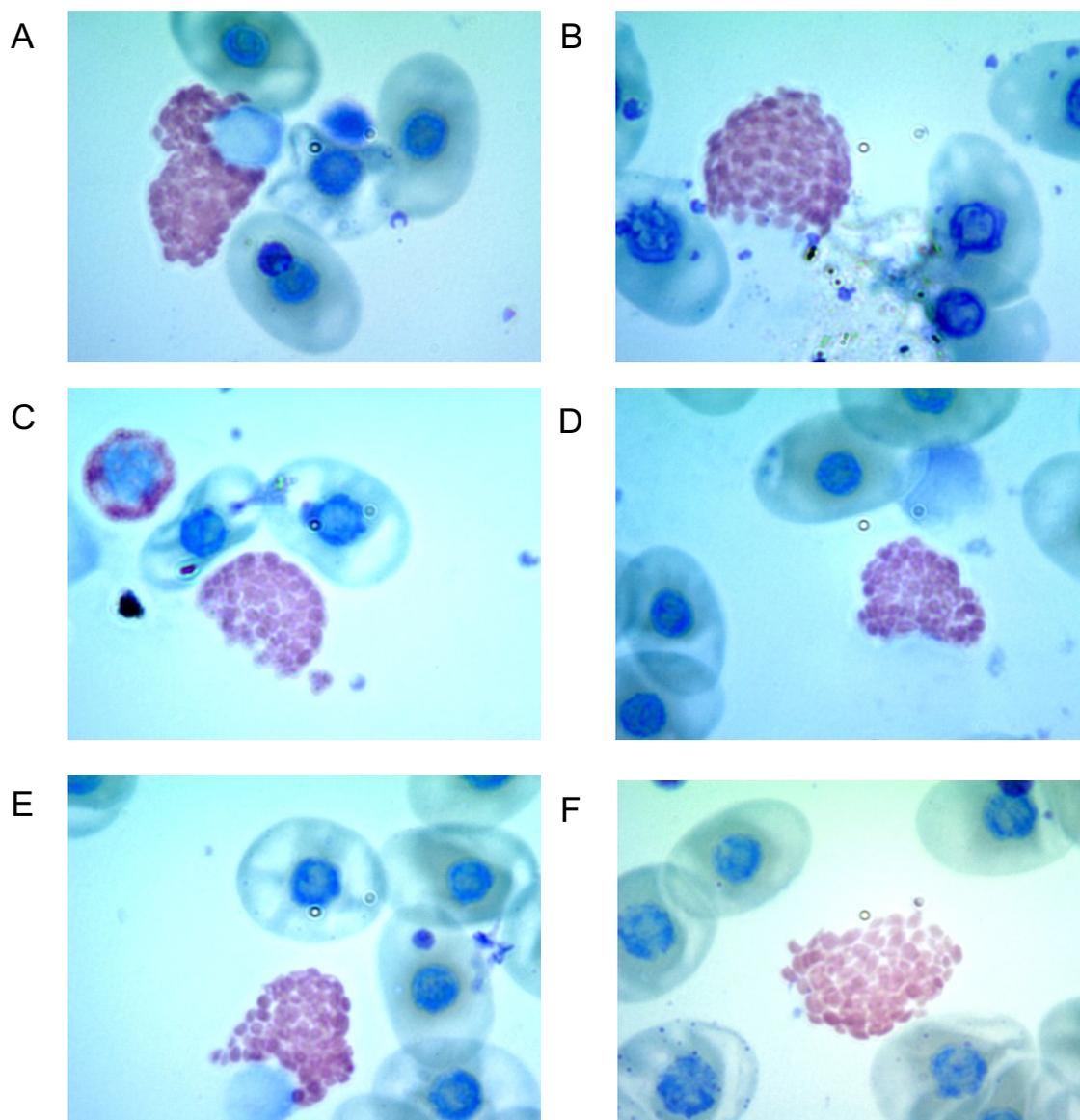


Figura 2. Alteraciones intracelulares en *Kinosternon leucostomum*. Célula binucleada (A), núcleo con puente nucleoplásmico (B), micronúcleo con puente nucleoplásmico (C), micronúcleo (D, E), lesión total del ADN nuclear (F).

En conclusión, se determinó que especímenes de la tortuga *K. leucostomum* de Comalcalco Tabasco, México presentaron diversas anomalías intracelulares, los cuales, pueden manifestar repercusiones en su progenie, así mismo, la evidencia de modificación del material genético desde el punto de vista citogenético y citológico en dichos organismos

da cabida a hipotetizar que otras poblaciones o especies pueden estar presentando las mismas condiciones que *K. leucostomum*, por lo que se recomienda extender los estudios en este campo, así como estudios que confirmen el agente genotóxico responsable de las alteraciones celulares registradas.

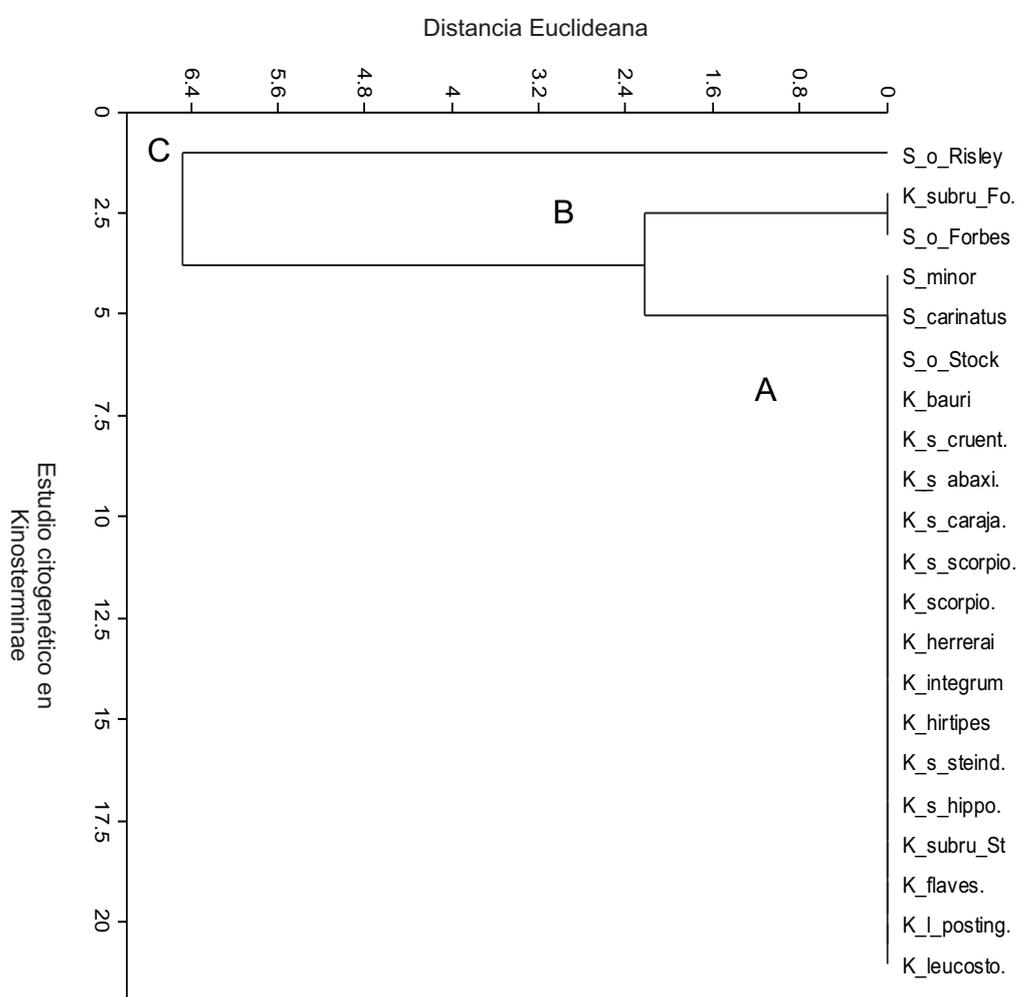


Figura 3. Análisis clúster citogenético en especies del grupo Kinosterninae. Característica citogenética principal: 2n=54 (A), 2n=54 (B), 2n=50 (C).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anze, R.; Franken, M.; Zaballa, M.; Pinto, M.R.; Zeballos, G.; Cuadros, M.A.; Canseco, A.; De la rocha, A.; Estellano, V.H. & Del granado, S. 2007. Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. *Redesma*, 2007: 53-74.
- Arias-Rodríguez, L.; Ibarra-Castro, L. & Páramo-Delgadillo, S. 2008. Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*, 56: 895-907.
- Banfalvi, G. 2011. *Cellular effects of heavy metals*. Springer.
- Bickham, J.W. 1975. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica*, 31: 198-204.
- Bucio-Luna, A. 2015. *Estudio intracelular en Thorichthys helleri, bioindicar de toxicidad en un ecosistema lagunar de Paraiso, Tabasco*. Tesis de Ingeniería Ambiental. Academia de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco. 60 p.
- Carraffa, E.; Bionda, C.L.; Pollo, F.E.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2013. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicológica Argentina*, 21: 78-84.
- Corredor-Santamaría, W.; Mora-Romero, C.C.; Escobar-Buitrago, P.S.; Cruz-Casallas, P.E. & Velasco-Santamaría, Y.M. 2012. Inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares en *Astyanax gr. Bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *Orinoquia Suplemento*, 16: 237-247.
- Díaz-González, G.; Vázquez-Botello, A. & Ponce-Vélez, G. 1994. Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP'S) disueltos en la laguna Mecoacán, Tabasco, México. *Hidrobiológica*, 4: 21-27.
- Forbes, W.R. Jr. 1966. *A cytological study of the Chelonia*. Tesis de Doctorado.
- Franco-Navia, J.F.; Ochoa-Vizarreta, R.; Sarmiento, W. & Huamán-Dueñas, E. 2010. El cariotipo de *Galea musteloides* y sus diferencias con los de *Cavia porcellus* y *Cavia tschudii* (Mammalia: Rodentia: Caviidae). *Acta Biológica Herreriana*, 1: 91-101.
- Gamboa, M.T.; Gamboa, R.; Saldívar, L. & Espejel, G. 2009. *Contaminación de metales en fauna silvestre*. División Académica de Ciencias Básicas – UJAT. 392-396.
- García-Ferreira, M.F. & Carreras-Arancibia, H.A. 2008. Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina, mediante el ensayo de micronúcleos. *Theoria*, 17: 33-40.
- García-Gutiérrez, C. & Rodríguez-Meza, G.D. 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicida en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8: 1-10.
- Gorman, G.C. 1973. *The chromosomes of the reptilian, a cytotaxonomic interpretation*. 347-424 p. *En: Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Chiarelli, A.B. & Capanna, E. Editorial Academic Press, New York.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4: 1-9.
- Hernández, L.E. & Cooke, D.T. 1997. Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1375-1381.
- Hernández-Acosta, L.; Qué-Ramos, F.J.; Piña-Guzmán, A.B. & Laines-Canepa, J.R. 2013. Uso de plaguicidas en zonas

- cañeras del municipio de Cárdenas Tabasco, México: posible impacto ambiental y a la salud. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales*, 6: 1-11.
- Hernández-Guzmán, J. 2009. Cariotipo del sapo común *Chaunus marinus* (Anura: Bufonidae) de Tabasco, México. Tesis de Licenciatura en Biología. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 45 p.
- Hernández-Guzmán, J. & Islas-Jesús, R.E. 2014. Malformation in tadpoles and presence of helminths in the frog *Lithobates vaillanti* (Anura: Ranidae) from Tabasco, Mexico. *The Biologist (Lima)*, 12: 407-411.
- Hernández-Guzmán, J.; Arias-Rodríguez, L. & Indy, J.R. 2011. Los cromosomas meióticos de la rana arborícola *Smilisca baudinii* (Anura: Hylidae). *Revista de Biología Tropical*, 59: 355-363.
- Hernández-Guzmán, J.; Indy, J.R.; Yasui, G.S. & Arias-Rodríguez, L. 2014. Los cromosomas de las tortugas tropicales *Kinosternon leucostomum*, *Trachemys scripta* y *Staurotypus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). *Revista de Biología Tropical*, 62: 671-688.
- Killebrew, F.C. 1975. Mitotic chromosomes of turtles, III The Kinosternidae. *Herpetologica*, 31: 398-403.
- Kligerman, A.D. & Bloom, S.E. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 266-269.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Mañas-Torres, F.; González-Cid urroz, M.B.; García-Ovando, H.; Weyers-Anchordoqui, I.; Ugnia-Vera, L.; Larripa-Hand, I.B. & Gorla-Abrate, N. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, 15: 53-60.
- Meharg, A.A. 1993. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant response to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell and Environment*, 17: 989-993.
- Nava-Ruíz, C. & Méndez-Armenta, M. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16: 140-147.
- Pérez, M.A.; Navarro, H. & Miranda, E. 2013. Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 45-64.
- Pollo, F.E.; Salas, N.E.; Mancini, M.A. & Martino, A.L. 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies íctias. *Acta Toxicológica Argentina*, 20: 62-67.
- Prieto, Z.; León-Incio, J.; Quijano-Jara, C.; Fernández, R.; Polo-Benites, E.; Vallejo-Rodríguez, R. & Villejas-Sánchez, L. 2008. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25: 51-58.
- Ramos-Herrera, S.; Broca-Martínez, L.F.; Laines-Canepa, J.R. & Carrera-Velúeta, J.M. 2012. Tendencia de la calidad de agua en ríos de Tabasco, México. *Ingeniería*, 16: 207-217.
- Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, 44: 239-443.
- Rosas, I.; Báez, A. & Belmont, R. 1983. Oyster (*Crassostrea virginica*) as indicator of heavy metal pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico.

- Water, Air and Soil Pollution, 20: 127-135.
- Sabath, E. & Robles-Osorio, M.L. 2012. Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. Revista Nefrología, 32: 279-286.
- Sites, J.W. Jr.; Bickham, J.W.; Haiduk, M.W. & Iverson, J.B. 1979. Banded karyotypes of six taxa of kinosternid turtles. Copeia, 1979: 692-698.
- Sotil, G., Alvis R.; Francia, J.C. & Shiga, B. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. Revista Peruana de Biología, 13: 249-253.
- Stock, A.D. 1972. Karyological relationships in turtles (Reptilia: Chelonia). Canadian Journal of Genetics and Cytology, 14: 859-868.

Received June 2, 2015.
Accepted September 14, 2015.