

LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE COMO BIOINDICADOR DE GENOTÓXICOS

MICRONUCLEUS BLOOD TEST AS GENOTOXIC BIOMARKER

⁵Cedano Díaz Antonio², Martínez González Sergio¹, Escalera Valente Francisco¹, Salgado Moreno Socorro¹, Carrillo Díaz Fernando¹, Macías Coronel Humberto¹, Peña Parra Bladimir¹.

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. ²Unidad Académica Preparatoria No. 4, Universidad Autónoma de Nayarit.

RESUMEN

Dentro de los múltiples daños de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico, expresado en sus diversas formas; como por ejemplo: teratogénesis, mutagénesis y por supuesto la cancerogénesis. Por esto, es importante detectar estos compuestos o agentes dañinos. Existen varias pruebas para identificar los agentes genotóxicos y la prueba de micronúcleo es la más sencilla y económica. Es posible utilizarla *in vivo* e *in vitro*, en plantas y animales. Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular. Hay animales que de forma espontánea presentan eritrocitos micronucleados y con el efecto de un inductor micronucleogénico este valor aumenta; sin embargo, hay seres vivos que de forma espontánea y aún con el efecto del inductor, no presentan eritrocitos micronucleados; esto se debe al buen control de filtrado del sistema hematopoyético, el cual a mayor edad es más eficiente.

Palabras clave: sustancias, genotóxicas, eritrocitos, cromosomas.

ABSTRACT

Among the multiple pollutants harm the genotoxic effect is expressed in various forms, such as teratogenicity, mutagenicity and carcinogenicity of course. Therefore, it is important to detect these compounds or harmful agents. There are several tests to identify genotoxic agents and the micronucleus test is the simplest and cheapest. It is

⁵Antonio Cedano Díaz. Unidad Académica Preparatoria No. 4, Universidad Autónoma de Nayarit. Domicilio Conocido. Tecuala, Nayarit. C.P. 63440. cedandiaz@hotmail.com

Recibido: 21/03/2011 Aceptado: 30/05/2012

possible to use it in vivo and in vitro, in plants and animals. Micronuclei are chromosome fragments or whole chromosomes that spontaneously or due to genotoxic agents, remain outside the nucleus during cell division. There are animals that spontaneously present micronucleated erythrocytes and with the effect of an inductor micronucleogénico this value increases, however, there are living beings who spontaneously and even with the effect of the inducer, do not present micronucleated erythrocytes; this is due to proper filter control of the hematopoietic system, which with increasing age it is more efficient.

Keywords: substances, genotoxic, erythrocytes, chromosomes.

INTRODUCCIÓN

Diversas actividades realizadas por el ser humano, así como también algunos eventos naturales contaminan el medio ambiente; debido a la liberación de agentes potencialmente tóxicos y genotóxicos. Actualmente constituye una preocupación mundial por los riesgos que afecta la salud humana y los ecosistemas (Córdoba, 2000; Klaassen y Watkins, 2001). Desafortunadamente, el desarrollo de la sociedad moderna se basa en la generación de una gran cantidad de sustancias químicas; muchas de las cuales ocasionan daño a los seres vivos, y entre ellos al hombre mismo (Álvarez, 2001).

Dentro de los múltiples efectos de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico, expresado en sus diversas formas, como por ejemplo: teratogénesis, mutagénesis y por supuesto la cancerogénesis. Por lo tanto, un agente genotóxico es todo aquel ente capaz de lesionar la integridad del material genético y/o sus componentes asociados. Entonces, bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN, provocando el aumento de mutaciones (mutagénesis); también los que interfieren en algunos procesos enzimáticos, así como en la reparación o en la génesis del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Lodish y Col., 2002).

Es importante señalar que los compuestos genotóxicos afectan con mayor frecuencia a las células normales que proliferan rápidamente, como son las células epiteliales y de médula ósea; por lo tanto, existe un gran número de células susceptibles a estos efectos dañinos (Goodman y Col., 1996).

Muchos contaminantes son capaces de provocar cambios permanentes y heredables en el ADN (mutación); con una frecuencia superior a la que ocurre de manera espontánea (mutagénesis). Si bien, es cierto que las mutaciones pueden tener lugar por agentes endógenos (Lewin, 2000); las mutaciones espontáneas son producidas en

ausencia de un mutágeno conocido; éstas se generan por situaciones o agentes propios del ambiente intracelular. Dichas mutaciones pueden originarse por errores en la replicación, o bien por reacciones que ocurren de forma espontánea como consecuencia de la inestabilidad química de la molécula de ADN, o de la acción de subproductos del metabolismo celular, denominados mutágenos endógenos (Lodish y Col., 2002; Luque y Herraéz, 2001).

Las mutaciones inducidas o exógenas son producidas por agentes físicos, químicos o biológicos; ajenos a la célula, y éstos son denominados mutágenos exógenos. La lista de estos agentes mutágenos es muy grande, y los mecanismos y efectos producidos son muy diversos; algunos actúan como mutágenos directos y otros requieren ser activados a carcinógenos activos, por la acción de ciertas enzimas, por ejemplo:

- 1).- Agentes alquilantes: transfieren grupos a un átomo nucleofílico de las bases nitrogenadas; generalmente metilo o etilo.
- 2).- Análogos de base: son los que al insertarse entre los pares de bases del ADN, distorsionan su estructura helicoidal, lo que provoca el desplazamiento del marco de lectura.
- 3).- Agentes bifuncionales: establecen enlaces cruzados entre bases de la misma hebra o de hebras opuestas; tales alteraciones afectan la integridad y/o configuración bioquímica del ADN y que al no ser corregidas antes de la replicación, por el sistema de reparación; conducen a mutaciones potencialmente cancerígenas (Lodish y Col., 2000; Luque y Herraéz, 2001).

Las mutaciones pueden ocurrir en las células somáticas o gaméticas. Cuando el daño se produce durante la gestación, el agente se convierte en un teratógeno, y cuando se presentan en las primeras, se relacionan con la aparición de cáncer; ya que dichas células adquieren el estado transformado, debido al aumento de la frecuencia de mutaciones; característica principal de un proceso cancerígeno (Álvarez, 2001).

Por lo anterior, es importante detectar las sustancias mutágenas, pues como ya se mencionó tienen la capacidad de alterar el material genético de los organismos incluyendo al hombre; provocando mutaciones en células somáticas con el desarrollo subsiguiente de cáncer, o teratogénesis (Lewin, 2000).

Estas se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, con micro o macro organismos. Entre estas se encuentran una variedad de pruebas, entre las que existen algunas muy económicas y rápidas; pero también las hay sumamente costosas: Entre ellas tenemos el cariotipo, el intercambio de cromátides hermanas, el índice mitótico, la prueba realizada en

Salmonella typhimurium o prueba de Ames y la prueba de micronúcleos (Griffiths y Col., 2000).

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

La prueba de micronúcleos, es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Esta indica el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular. En hematología, los micronúcleos se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, su forma es generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras (Heddle y Col., 1991; Schmid, 1975; Fuic y Mijic, 1999). La prueba de micronúcleos permite detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Los agentes aneuploidogénicos (como colchicina, vincristina y vinblastina), se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Mientras que los agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos (como la ciclofosfamida, la arabinosa-c, el busulfan y el metotrexate), actúan como análogos de base. Por lo tanto se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica. Los compuestos aneuploidogénicos causan micronúcleos más grandes que los causados por los agentes clastogénicos (Hatanaka y Col., 1992).

Se pueden diferenciar unos de otros, por la presencia del centrómero y/o cinetocoro; mediante la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente), ya que si los micronúcleos presentan centrómero, generalmente estará formado por un cromosoma completo (micronúcleo centrómero positivo), de lo contrario estará formado por un fragmento cromosómico acéntrico o micronúcleo centrómero negativo (Dorothea y Col., 1998).

FORMACIÓN DE LOS MICRONÚCLEOS

Los cambios más frecuentes en el ADN son la sustitución de una base por otra, y las deleciones o pérdidas de secuencias. Si bien, las deleciones pueden ser bien de una o dos pares de bases, hasta deleciones de cientos de kilobases. Normalmente, tras la

ruptura de la cadena de ADN, los extremos resultantes se suelen unir rápidamente por la acción de enzimas de reparación. La rotura puede ocurrir en un solo punto, o en dos puntos; y si no se repara el fragmento o fragmentos que no contienen el centrómero, se perderá en la siguiente división celular.

El centrómero se puede considerar el centro cinético del cromosoma, pues sobre él se sitúan las estructuras llamadas cinetocoros; a las cuales se unen las fibras que constituyen el huso acromático o huso mitótico. Estas fibras o filamentos formados por microtúbulos son de naturaleza proteica, que sirven como rieles en el huso mitótico durante la separación de las dos cromátides en la división celular. De esta forma se produce la segregación ordenada de los cromosomas y cada célula hija recibe una cromátide de cada cromosoma, es decir, idéntica dotación genética. La ausencia de centrómero (cromosoma acéntrico) impide que el cromosoma se una al huso mitótico, y por lo tanto, que se incluya en el núcleo de las células hijas (Griffiths y Col., 2000; Luque y Herraiz, 2001).

De acuerdo a lo anterior, los micronúcleos pueden ser formados durante la transición de metafase/anafase de la mitosis. Durante la división celular, etapas en las cuales ocurre la separación de cromátides; son reconocidos dos mecanismos por los cuales se pueden formar los micronúcleos:

1).-Pérdida mitótica de fragmentos acéntricos: es considerado el mecanismo clásico, donde cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero, darán origen a los núcleos de las células hijas regulares. Los elementos rezagados quedarán incluidos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios, que como regla, son mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de micronúcleo.

2).- Pérdida mitótica de cromosomas completos: esto sucede cuando se daña el funcionamiento del aparato mitótico, por ejemplo: bajo la influencia de la colchicina, el núcleo principal es algunas veces reemplazado por un grupo de pequeños núcleos; los cuales son en general considerablemente más grandes que el típico micronúcleo; esto es debido a que los cromosomas completos son los que constituyen a estos micronúcleos (Heddle y Col., 1991).

ERITROPOYESIS EN MAMÍFEROS

El normoblasto ortocromático, 5 horas después de la última mitosis, expulsa su núcleo; proceso que incluye aproximación a la periferia y finalmente aislamiento y liberación del mismo. Los normoblastos pierden su núcleo al pasar de la médula ósea al torrente circulatorio, debido a que los poros entre las células endoteliales de los sinusoides medulares, tienen un diámetro menor que el núcleo del normoblasto por lo que al atravesar dichos poros, la membrana y el citoplasma, que son deformables, pasan fácilmente; pero el núcleo queda atrapado. La membrana se desgarró pero es reparada, el núcleo expulsado queda en la médula y es fagocitado por los macrófagos del estroma medular (Swenson y Reece, 1999; Lewin, 2000).

Al perder su núcleo, el normoblasto ortocromático se convierte en reticulocito (eritrocito policromático), que es el eritrocito joven que sale a la circulación. Los eritrocitos policromáticos tardan aproximadamente 48 horas para convertirse en eritrocitos maduros (eritrocitos normocromáticos); y es a medida que aumenta el contenido de hemoglobina, el citoplasma se vuelve menos azul y más rojo. Los eritrocitos policromáticos constituyen aproximadamente 1 % del total de la masa eritrocítica circulante, y el 99 % restante son eritrocitos normocromáticos. Sin embargo existen especies como los equinos, los bovinos, ovinos y caprinos en los que no se observan en circulación periférica los eritrocitos policromáticos, debido a que la vida media del eritrocito es prolongada y el reticulocito madura en la médula ósea (Swenson y Reece, 1999).

Las células del sistema reticuloendotelial destruyen los eritrocitos viejos, malformados o con inclusiones. Estas células, conocidas también como histiocitos, macrófagos o clasmátocitos, varían en tamaño, aspecto y localización; poseen la propiedad de ingerir materia particulada. Las células reticuloendoteliales incluyen a las células estrelladas o de Kupffer que se encuentran en las paredes de los senos sanguíneos del hígado, a otras células similares del bazo y a ciertas células de la médula ósea y de los ganglios linfáticos. La médula ósea roja es el principal sitio de destrucción de eritrocitos en la mayoría de los animales domésticos; mientras que en el humano es el bazo el más importante; y lo es menos importante en los conejos y en el cobayo; mientras que en las aves el hígado parece ser el sitio principal de destrucción de eritrocitos dañados (Swenson y Reece, 1999).

Es imprescindible señalar que en los mamíferos, después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (aproximadamente cinco horas después de completar la última mitosis), por razones no conocidas los micronúcleos permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es cuando es posible visualizarlos (Schmid, 1975).

BIOMONITORES UTILIZADOS

La prueba de micronúcleos es ampliamente aceptada y es posible utilizarla *in vivo* e *in vitro* en diversas especies, así como en especies de laboratorio y silvestres; entre ellos se encuentra: al humano, rata, ratón, hámster, primates, anfibio, aves, peces y moluscos; y en gran variedad de tejidos como: sangre periférica, reticulocitos de la médula ósea, linfocitos, hepatocitos y en células de mucosa bucal (Zúñiga y Col., 1996; Zúñiga y Col., 2000; Zúñiga y Col., 2001; Álvarez, 2001; Se y Col., 2003; Cristaldi y Col., 2004).

Por otra parte también es posible aplicar esta técnica en plantas, ya que también pueden ser biomonitores de agentes genotóxicos micronucleogénicos; este es el caso del haba y la cebolla (*Vicia faba*, *Allium cepa*) en la que se utilizan los meristemos de la raíz para la observación de los micronúcleos, o *Tradescantia* en la que se utiliza el polen (Grant y Col., 1992; Ma y Col., 1995; Helma y Col., 1995).

En el ratón se presenta un número importante de eritrocitos micronucleados espontáneos, y se recomienda usarlo como un biomonitor de genotóxicos, mediante el conteo de eritrocitos policromáticos y reticulocitos en pruebas a corto tiempo y de exposición aguda a genotóxicos (Kishi y Col., 1992).

En un estudio realizado para determinar la frecuencia de eritrocitos micronucleados en 35 especies de mamíferos, con el objetivo de seleccionar a aquellas que presenten el mayor número de éstos, para proponerlos como probables biomonitores de daño genotóxico; mostró que las especies con valores más altos por cada 10,000 eritrocitos, son: el ratón con 21.4 ± 6.5 , la jirafa con 18.0 ± 0.0 , el gato con 8.4 ± 2.5 , el gato siamés con 11.0 ± 0.9 , el gerbo con 9.4 ± 1.3 , el hámster con 6.3 ± 1.0 , la zarigüeya con 7.5 ± 0.0 y el cerdo con 6.9 ± 4.0 (Zúñiga y Col., 1996).

Investigaciones en sangre periférica de gatos expuestos a colchicina y arabinosa C, durante cuatro días en el estudio de la inducción de micronúcleos, demuestran un incremento significativo de eritrocitos micronucleados (Zúñiga y Col., 1998).

Tradicionalmente, se exponen a los probables biomonitores una vez a un genotóxico conocido y se toman muestras 24 y 48 horas después. Debido a que los eritrocitos policromáticos aparecen en la circulación en este tiempo; su aparición o presencia indica la certeza de que los eritrocitos policromáticos micronucleados son originados por la exposición al agente probado. Los eritrocitos policromáticos son los eritrocitos jóvenes que posteriormente maduran a eritrocitos normocromáticos, y por esta razón,

cuando son expuestos a genotóxicos en forma continua, es notable el incremento de eritrocitos micronucleados, por su acumulación (Zúñiga y Col., 1998; Lodish, 2002).

En un estudio hecho en cerdos jóvenes (16-18 semanas), se encontró incremento significativo de eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica, inducidos con diferentes grados de rayos X; demostrando así que es factible usar al cerdo para llevar a cabo la prueba de micronúcleos con el fin estimar daños citogenéticos, así como para valorar el efecto de compuestos potenciales de genotoxicidad. por otra parte, también se demostró que los cerdos (5 semanas de edad), reflejan de manera eficiente el efecto de potentes micronucleogénicos en reticulocitos; sin embargo, a esta edad presentan el inconveniente de tener una producción de eritropoyesis inestable, que interfiere con la interpretación de resultados (Ludewig y Col., 1991; Cedano y Col., 2011).

Los eritrocitos micronucleados basales encontrados en cerdos jóvenes (5 semanas), es de $17.8 \pm 8.38/10,000$ eritrocitos, que difieren con los obtenidos en cerdos adultos (25 semanas) de $6.9 \pm 4/10,000$; esta diferencia tan marcada de eritrocitos micronucleados entre animales jóvenes y adultos, concuerda con los resultados obtenidos en estudios con ardillas y gatos jóvenes comparados con adultos (Zúñiga y Col., 2001; Zúñiga y Col., 1998; Zúñiga y Col., 2001).

En tanto, los eritrocitos policromáticos micronucleados basales en cerdos de 6 a 7 y de 16 a 18 semanas, se encontraron valores de 3.55 ± 3.0 y 1.76 ± 1.0 respectivamente (Zúñiga y Col., 2001; Ludewig y Col., 1991).

Por otra parte, estudios en niños prematuros, así como en ratas, conejos, cerdos, perros y gatos lactantes, tienen un número espontáneo de eritrocitos micronucleados, debido a que el sistema retículo endotelial es inmaduro a esta edad; por lo contrario en los animales y en el humano, los eritrocitos micronucleados espontáneos disminuyen al aumentar la edad, lo cual pudiera deberse a la maduración del sistema retículo endotelial y por lo tanto una mayor eficiencia en la eliminación de células con inclusiones eritrocitarias (Zúñiga y Col., 2001; Se y Col., 2003).

La presencia de los micronúcleos, se ha observado en algunos animales cuyo control de calidad que ejerce el sistema reticuloendotelial, principalmente el bazo, es menor; y por tanto, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos micronucleogénicos, los eritrocitos micronucleados se incrementan de manera significativa y pueden ser organismos con características de bioindicadores naturales (Zúñiga y Col., 1998).

Los micronúcleos están presentes espontáneamente en diferentes células, en el caso de los eritrocitos, varían desde 0 hasta 28 eritrocitos micronucleados, dependiendo de la especie y para el caso del humano en función de su condición de esplenectomizado (Zúñiga y Col., 2000; Zúñiga y Col., 1996; Zúñiga y Col., 2001). En el ser humano, en condiciones normales el número de eritrocitos con micronúcleos espontáneos en sangre periférica es casi cero por cada 10,000 eritrocitos (Zúñiga y Col., 1996) y se ha demostrado que aún recibiendo drogas genotóxicas antineoplásicas con conocida micronucleogenicidad, el valor de eritrocitos micronucleados en sangre periférica no se eleva de manera importante; debido a la eficiencia del bazo para eliminar los eritrocitos dañados (Corazza y Col., 1990).

Sin embargo, en pacientes esplenectomizados, se incrementa el número de eritrocitos micronucleados de manera significativa a valores de $29.5 \pm 5.8/10,000$ eritrocitos; y si en estas condiciones los pacientes se exponen a un genotóxico propio de su tratamiento médico, este valor se incrementa hasta $65 \pm 17.7/10,000$ eritrocitos (Zúñiga y Col., 1998).

Por lo tanto, la esplenectomía puede ser utilizada como una herramienta en especies en las que el bazo es el responsable de eliminar a los eritrocitos micronucleados de la circulación (Zúñiga y Col., 1996, Torres-Bugarín y Col., 1999).

En otros animales como el conejo, se encontró un valor basal de eritrocitos micronucleados, bajo el cual no se incrementó con inductores micronucleogénicos; aunque tampoco con la esplenectomía en presencia de inductores; esto indica que en ausencia del bazo, otros órganos como el hígado pudieran suplir la función del bazo. Así mismo, en estudios con hámster, gerbo y rata, expuestos a la colchicina (0.26 mg/kg), y a la arabinosa C (6 mg/kg) durante cuatro días, no se encontró incremento de eritrocitos micronucleados; sin embargo al extirparles el bazo hubo un incremento significativo en el número de eritrocitos micronucleados (Zúñiga y Col., 2001).

La comparación entre estas cuatro especies, demostró que la frecuencia en las ovejas y en el caballo es perceptiblemente más alto el número de micronúcleos en sangre periférica que en médula; mientras que en bovinos es más alta la frecuencia en eritrocitos procedentes de la médula; sin embargo, en cerdos la diferencia no es significativa. Estos resultados podrían indicar que en el bovino y en el cerdo el bazo está implicado en el retiro de eritrocitos de la circulación periférica (Cristaldi y Col., 2004).

CONCLUSIÓN

Se concluye que la prueba de micronúcleos en sangre es ampliamente usada en diferentes especies animales y apoya a otras técnicas diagnosticas de daño genotóxico.

LITERATURA CITADA

ÁLVAREZ MC. 2001. Genética, ambiente y salud. 2ª ed. México: Universidad de Guadalajara.

CEDANO D, Martínez GS, Torres-Bugarín O, Zúñiga GG, Trujillo HB. (2011). Estudio de la factibilidad del cerdo como modelo indicador de agentes genotóxicos mediante el conteo de eritrocitos micronucleados. *Abanico Vet.* 1(2) 21-26.

CORAZZA G, Ginaldi L, Zoli G, Frisoni M, Lalli G, Gasbarrini G, Quaglino D. (1990). Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A resessment. *Clinical Lab Haematol.* 12:269-275.

CÓRDOBA D. 2000. Toxicología. 4ª ed. Colombia: Manual Moderno.

CRISTALDI M, Anna L, Udriou I, Zilli R. (2004). Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutat Res*, 559, 1-9.

DOROTHEA K, Stephen D, Nikki E, Carol R. (1998). An automated method for discriminating aneugen-vs. Clastogen-induced micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 31:340-344.

FUIC A, Mijic A. (1999). In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicity research. *Arh Hig Rada Toksikol.* 50: 299-306.

GOODMAN GA, Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R. 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 9ª ed. México: Mc. Graw-Hill Interamericana.

GRANT WF, Lee HG, Logan DM, Salamone MF. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic enviroment. *Mutat Res.* 270:53-64.

GRIFFITHS A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W. 2000. *An introduction to genetic analysis.* 7ª ed. USA: Freeman and company.

GUÍZAR-VÁZQUEZ J. 1994. *Genética Clínica.* 2ª ed. Manual Moderno. México.

Hatanaka Y, Kitagawa Y, Toyoda Y, Kawata T, Ando N, Kawabata Y, Iwai M, Arimura H. (1992). Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat Res.* 278:99-101.

HEDDLE J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, McGregor J. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage : past, present and future. *Environ Mol Mutag.* 18:277- 291.

HELMA C, Kronberg L, Ma TH, Knasmüller S. (1995). Genotoxic effects of the chlorinated hydroxifuranones 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and 3,4-dichloro-5-hydroxy-2(5H)-furanone in *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat Res.* 346:181-186.

JENA GB, Bhunya SP. 1995. Use of chick, *Gallus domesticus*, as an in vivo model for the study of chromosome aberration: A study mitomycin C and probable location of a "hot spot". *Mutat Res.* 334:167-174.

KISHI M, Horiguchi Y, Watanabe S, Hayashi M. (1992). Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutat Res.* 278, 205-208.

KLAASSEN CD, Watkins JB. 2001. *Manual de Toxicología.* 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.

LEWIN B. 2000. *Genes VII.* 2ª ed. USA: Oxford University Press, Inc. New York.

LODISH H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular.* 4ª ed. España: Médica Panamericana.

LUDEWIG E, Koch F, Kamprad F, Melzer R. (1991). The micronucleus test in pigs: induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes by various doses of x-rays. *Mutat Res.* 249:1-6.

LUQUE J, Herraiz A, 2001. *Biología Molecular e Ingeniería Genética.* 1ª ed.. España: Harcourt.

MA TH, Xu Z, Xu C, McConell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H. (1995). The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res.* 334,185-195.

RODRÍGUEZ A, Nieves A, Navas JI, Dorado G, López-Barea J, Pueyo C. (1992). Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ Mol Mutagen.* 19:112-124.

SCHMID W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res.* 31:9-15.