

EFECTO GENOTÓXICO DEL DICROMATO DE POTASIO EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE *Oreochromis niloticus* (TILAPIA)

Zulita Prieto^{1,a}, Julio León-Incio^{1,a}, Carlos Quijano-Jara^{1,a}, Radigud Fernández^{1,a}, Edgardo Polo-Benites^{1,a}, Roger Vallejo-Rodríguez^{1,b}, Luis Villegas-Sanchez^{1,b}

RESUMEN

Existen múltiples reportes del efecto genotóxico y cancerígeno del cromo VI, los seres humanos tenemos una permanente exposición a este elemento. **Objetivos.** Evidencias la genotoxicidad del dicromato de potasio utilizando como sistema biológico a *Oreochromis niloticus* "tilapia", mediante el test de micronúcleos y la cuantificación de *nuclear buds*, en eritrocitos de sangre periférica. **Materiales y métodos.** Los individuos fueron expuestos a concentraciones crecientes (0,0, 0,2, 0,4 y 0,8 ppm) de dicromato de potasio. Se obtuvieron muestras de sangre periférica, del arco branquial de cada individuo (cuatro por grupo), a los tres y siete días de tratamiento, las cuales fueron procesadas y coloreadas con Giemsa 5% y se cuantificaron eritrocitos con micronúcleos y *nuclear buds* en sangre periférica. **Resultados.** Se encontró un incremento significativo de las frecuencias de micronúcleos y *nuclear buds* directamente proporcional a la concentración del dicromato de potasio en los individuos expuestos ($p < 0,05$). **Conclusiones.** El dicromato de potasio produce daño genético en los eritrocitos de *O. niloticus*.

Palabras clave: Genotoxicidad; Cromo; Dicromato de potasio; Modelos biológicos; Pruebas de micronúcleos (fuente: DeCS BIREME).

GENOTOXIC EFFECT OF POTASSIUM DICROMATE IN PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES OF *Oreochromis niloticus* (TILAPIA)

ABSTRACT

Due multiple reports of the genotoxic and carcinogenic effect of chromium VI and the permanent exposure of the human beings to this element. **Objective.** Contributing new evidence of the genotoxicity of potassium dichromate using the biological system *Oreochromis niloticus* "tilapia" through the micronucleus test and the nuclear quantification of buds in erythrocytes of peripheral blood. **Material and methods.** The individuals were exposed to increasing concentrations (0.0, 0.2, 0.4 and 0.8 ppm) of potassium dichromate. Peripheral blood samples of the branchial arc of each individual were taken at 3th and 7th day of treatment which were processed and colored with Giemsa 5%, erythrocytes in peripheral blood with micronuclei and nuclear buds were quantified. **Results.** A significant increase of frequencies of micronucleus and nuclear buds in the exposed individuals were registered which were directly proportional to the potassium dichromate concentration ($p < 0.05$). **Conclusions.** Potassium dichromate caused genetic damage in the cells of *O. niloticus*.

Key words: Genotoxicity; Chromium; Potassium dichromate; Biological models; Micronucleus test (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

El incremento de riesgo al cáncer pulmonar está asociado a la exposición a compuestos que contienen cromo hexavalente (CrVI) ⁽¹⁾. Estudios epidemiológicos presentan al cromo hexavalente insoluble ($PbCrO_4$) y

relativamente insoluble ($ZnCrO_4$) con mayor actividad carcinogénica que la forma soluble, como el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) ⁽²⁾. No obstante a estas diferencias, la capacidad carcinogénica dependerá en gran medida del tiempo y dosis de exposición al cromato.

¹ Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

^a Biólogo; ^b Estudiante de biología.

La población humana está expuesta al Cr(VI) de manera masiva y permanente debido al aumento progresivo de la contaminación ambiental con cromo hexavalente a causa de emisiones industriales (3-6). Una fuente importante del Cr(VI) lo constituyen los dicromatos de potasio y de sodio, que son utilizados en la industria de cromados, manufactura de pigmentos, colorantes, curtido de pieles, en la preparación de antisépticos, en la limpieza de material de vidrio de laboratorio, como agente valorante, entre otros. En el Perú, no hay un monitoreo de las emisiones de Cr(VI), como se realiza en otros países (3,4), existen industrias que en muchos casos, trabajan de manera artesanal y no cuentan con medidas de bioseguridad suficientes.

El Cr (VI) existe en las formas aniónicas CrO_4^{2-} , $HCrO_4^-$ o $Cr_2O_7^{2-}$, dependiendo del pH del medio (7) y tiene la capacidad de ingresar a la célula utilizando la vía general de los canales proteicos transportadores de aniones (8). Al ingresar al espacio intracelular, el cromo (VI) interacciona con agentes reductantes e inicia un proceso reductivo a los estados Cr(V), Cr (IV) y Cr(III), generando una fuerza oxidativa capaz de producir lesiones en el DNA, aductos Cr-DNA, uniones cruzadas DNA-DNA, DNA-proteínas, sitios apurícos, entre otros (9). Los mecanismos de transporte del cromo a nivel celular, la interacción con agentes reductantes como el glutatión (10) y uniones con el DNA, no se encuentran totalmente esclarecidos.

Ensayos ecotoxicológicos en *Artemia salina* muestran la toxicidad aguda del $K_2Cr_2O_7$ (11). Investigaciones sobre la genotoxicidad de éste compuesto se han realizado en *Sacharomices* (12), *Procambarus clarkii* (13), *Pseudokirchneriella subcapitata* (14), *Mus domesticus* (15); en esta última especie, existe conclusiones que difieren sobre la genotoxicidad del dicromato de potasio cuando se administra por vía oral (16-17).

Los peces, como *Oreochromis niloticus*, son considerados sistemas genéticos de especial interés para investigaciones *in vivo* en la evaluación de contaminantes acuáticos (18), y teniendo en cuenta la contaminación ambiental con cromo VI, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto genotóxico en *Oreochromis niloticus* "tilapia" expuestas a concentraciones crecientes de dicromato de potasio, mediante la cuantificación de eritrocitos con micronúcleos y *nuclear buds* en sangre periférica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los peces *Oreochromis niloticus* procedentes del centro piscícola de Guadalupe, Perú, fueron aclimatados a condiciones de laboratorio, a una temperatura de 22 ± 2 °C, en agua de clorinada y aireación continua. Después de dos semanas de aclimatación, se seleccionó 16 individuos de tamaño uniforme, en un rango de 12 a

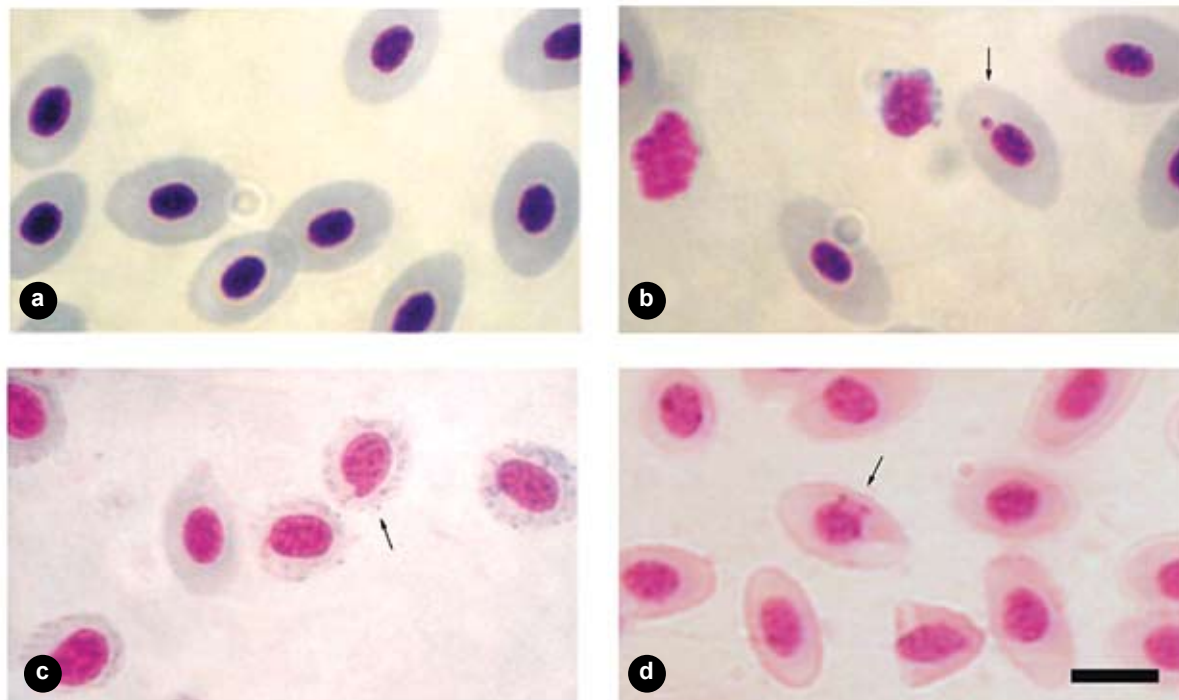


Figura 1. Eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* a) Eritrocitos normales, b) Eritrocito con micronúcleo, c y d) Células con *nuclear buds*. Coloración Giemsa 5%. Barra 10 μ m.

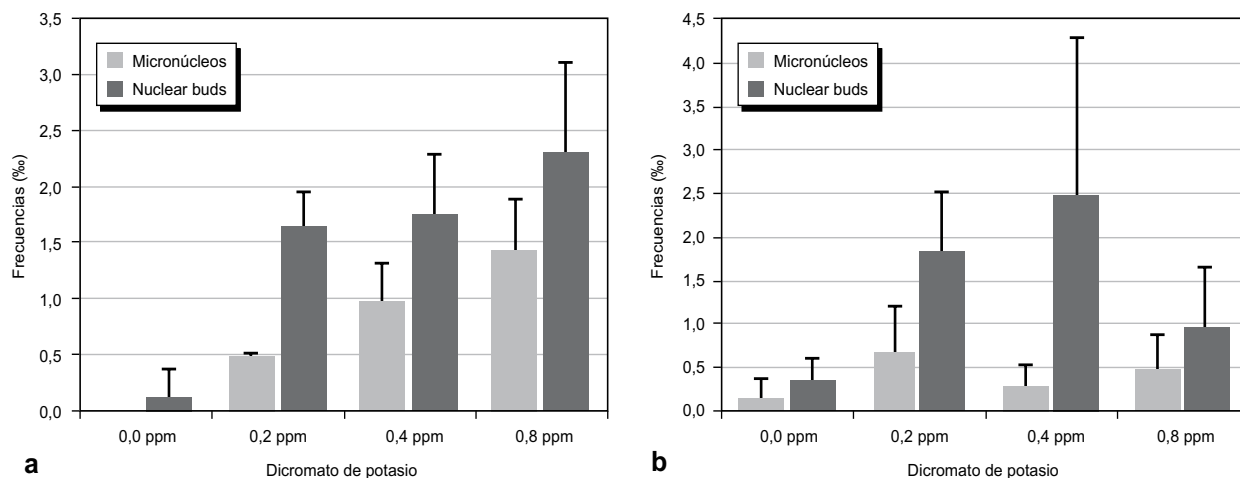


Figura 2. Frecuencias (%) de micronúcleos y *nuclear buds* en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* a los tres (a) y siete (b) días de exposición al dicromato de potasio.

n= 16 individuos, 4 por cada tratamiento y 2000 eritrocitos evaluados en cada uno, * p<0,05.

14 cm de longitud total y se incluyó cuatro individuos en cada grupo, los que fueron colocados en acuarios de 15x20x20 cm conteniendo 0,0, 0,2, 0,4 y 0,8 ppm de dicromato de potasio en 30 litros. Los ejemplares fueron mantenidos durante una semana bajo las mismas condiciones de aireación y alimento.

Se tomó muestras de sangre del arco branquial de los peces a los tres y siete días de tratamiento. Con las muestras de sangre de cada individuo se realizó extendidos celulares, se dejó secar a temperatura ambiente, se fijó en etanol absoluto por 20 minutos y se coloreó con Giemsa 5% durante 30 minutos⁽¹⁹⁾.

Se realizó el conteo de 2000 eritrocitos por individuo utilizando un microscopio óptico a 1000X de magnificación. Los criterios de identificación de micronúcleos (MN) fueron: estructura redondeada de tamaño pequeño, diámetro significativamente inferior al núcleo principal, con coloración similar y clara separación del núcleo principal⁽²⁰⁾ y los eritrocitos con brotes o micronúcleos con una conexión cromatinica al núcleo celular⁽²¹⁾ fueron clasificados como *nuclear buds* (brotes nucleares). Se estimaron las frecuencias (%) de micronúcleos y *nuclear buds* y se realizaron las comparaciones estadísticas entre tratamientos mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la relación entre variables con el análisis de regresión, considerando un p<0,05 como significativo.

RESULTADOS

En sangre periférica de *O. niloticus*, los eritrocitos con núcleo en posición central de forma elíptica de

contornos definidos corresponden a eritrocitos normales (Figura 1a). Por efecto del dicromato de potasio se observaron alteraciones en la morfología nuclear y sólo se cuantificaron eritrocitos con micronúcleos (Figura 1b) y eritrocitos con brotes nucleares "*nuclear buds*" (Figuras 1c y 1d).

Las frecuencias de las células con micronúcleos y *nuclear buds* estuvieron aumentadas con respecto al control, siendo significativa la diferencia entre el tratamiento con respecto al control, a los tres días de exposición al dicromato de potasio (p<0,05, Figura 2a). El valor promedio para micronúcleos en la concentración 0,8 ppm fue de 1,43 % ± 0,45 y para *nuclear buds* de 2,30 % ± 0,80 y en el control, 0,0 y 0,12 % ± 0,25. Después de siete días, las frecuencias disminuyeron tanto para micronúcleos como para los *nuclear buds* y no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2b).

Se determinó el aumento de las frecuencias de micronúcleos y *nuclear buds* en función de la dosis de dicromato de potasio, el coeficiente de regresión para micronúcleos fue de 0,14 % ± 0,13 y para *nuclear buds* de 0,58 % ± 0,25 (p<0,01) a los tres días de exposición.

Además de las alteraciones nucleares, a los siete días de exposición se observó un incremento de células de forma redondeada de tamaño similar a la de los eritrocitos y con núcleos excéntricos, principalmente en uno de los individuos, que antes de la exposición al dicromato de potasio ya presentaba un gran número de eritrocitos de forma elíptica pero con núcleos de posición excéntrica (Figura 3).

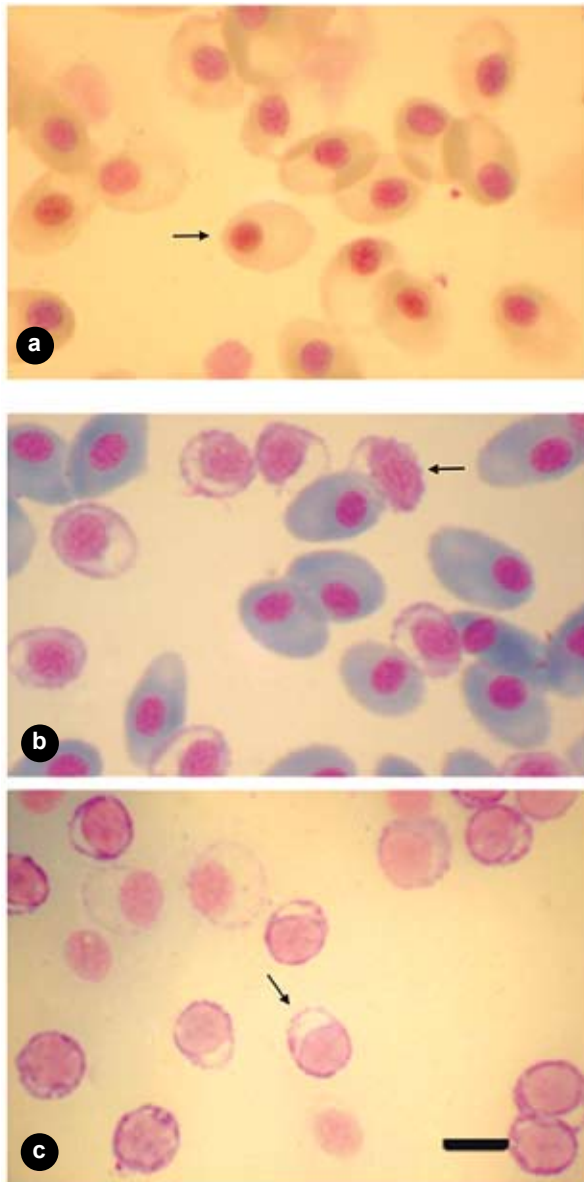


Figura 3. Eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* a) células antes de la exposición al dicromato de potasio. b y c) Células después de siete días de tratamiento con dicromato de potasio. Coloración Giemsa 5%. Barra 10 µm.

DISCUSIÓN

La morfología de los eritrocitos maduros en individuos de *O. niloticus* no expuestos al dicromato de potasio coinciden con la morfología de los eritrocitos normales en *Galaxias maculatus*⁽²²⁾, *Cyprinus carpio* "carpa"⁽²³⁾, *Brycon amazonicus*⁽²⁴⁾ y otras especies de peces. La presencia de eritrocitos de forma redondeada, coinciden con la morfología de eritrocitos inmaduros de *Brycon amazonicus*²⁴. El incremento de eritrocitos inmaduros podría deberse a una respuesta frente al estado de estrés causado por el dicromato de potasio, investigaciones

en trucha han registrado un incremento de eritrocitos inmaduros en una fase preadaptativa a condiciones de estrés por cambios ambientales⁽²⁵⁾.

El daño genético producido por el Cr(VI) de $K_2Cr_2O_7$ se observó por un incremento de micronúcleos y *nuclear buds* en los eritrocitos de sangre periférica de *O. niloticus*. La regresión estimada entre las concentraciones utilizadas y los valores de MN y *nuclear buds* demuestran un efecto dosis dependiente durante la exposición a los tres días con $K_2Cr_2O_7$. De acuerdo a los trabajos realizados en diferentes especies y con diferentes genotóxicos, se observa que durante los primeros días de exposición existen incrementos progresivos de micronúcleos y después de esos días los valores disminuyen.

Después de siete días de exposición al $K_2Cr_2O_7$, encontramos una disminución de las frecuencias de MN y *nuclear buds*, Cavas *et al.* registraron un aumento a los tres días de tratamiento y disminución a los seis días en la misma especie expuesta a efluentes textiles⁽²⁶⁾, Palhares *et al.* también en la misma especie con aplicación intraabdominal de mitomicyn C reportaron disminución de MN después de cinco días⁽²⁷⁾, experimentos con ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, bleomicina y mitomicina encontraron incrementos entre los dos a siete días y a los 14 días disminuyó la frecuencia de MN, y a los 30 días disminuyeron aun más sus valores⁽²⁸⁾; por la exposición de *Pimephales promelas* a agua de río contaminada con residuos industriales, se evidenció un incremento a los 14 días y disminución a los 21 días⁽²⁹⁾. Estas variaciones en la disminución de MN después de una fase de incremento, dependen del tipo de genotóxico, la concentración utilizada, la forma de administración y la respuesta genética que tenga cada especie.

Los valores encontrados con el test de micronúcleos a las concentraciones de 0,4 ppm, están dentro del rango de los valores individuales reportados por Sienna *et al.*¹³ que registró valores entre 0,33 y 2,0 ‰ en células de hemolinfa del cangrejo *P. clarkii* expuestas a 400 µg/L de dicromato de potasio durante siete días. Estudios en eritrocitos de sangre periférica en *Carassius auratus* expuestos a cadmio ($CdCl_2$) reportan valores promedios similares, de 0,33 a 1,75 ‰ en aumento progresivo de acuerdo a la concentración dentro de dos a cinco días de tratamiento⁽³⁰⁾, a pesar de ser especies acuáticas distintas.

Sin embargo, comparando los resultados obtenidos con los realizados en *O. niloticus* utilizando otros genotóxicos se encuentra alta variación en la formación de micronúcleos, así por ejemplo, en muestras de sangre periférica de *O. niloticus* a los dos días de

exposición a ciclofosfamida muestra un valor de 14,68 ‰, con 5-fluorouracilo 1,25, con bleomicina 1,58, con mitomicina 1mg/kg 1,25 (28), con mitomicina 2mg/kg 2,1 y a los tres días 3,8‰ (27), con efluentes textiles 6,56 ‰ (26), con atrazine 25ug/L 1,19 ‰ (31), entre otros. Además, así como hay diferencias entre diferentes tipos de genotóxicos en cuanto a su capacidad de alterar al DNA, trabajos realizados en una misma especie ante un mismo genotóxico muestran diferencias en los valores de MN en diferentes tejidos (27,29).

En relación a los *nuclear buds*, las frecuencias registradas a los tres días de tratamiento fueron significativamente mayores que las frecuencias de MN. Este marcador es factible de ser cuantificado de manera objetiva al igual que las células con micronúcleos y ser utilizados en los ensayos de genotoxicidad en peces. Según estudios previos (19,26,31,32), las alteraciones en las formas nucleares fueron clasificados en: núcleos con hendidura (*blebbed nuclei*), núcleos lobulados (*lobed nuclei*), núcleos vacuolados (*vacuolate nuclei*), *broken-eggs*, *nuclear buds*, entre otras, son cuantificados de manera independiente y conjuntamente como una sola clasificación: anomalías nucleares. En todos los casos, las comparaciones entre tratamientos presentan un alto grado de significancia contrastable con el control negativo y positivo. En este trabajo se cuantificó como *nuclear buds* a todos los núcleos que tienen brotes nucleares claramente definidos.

La formación de los *nuclear buds* se relaciona con la amplificación del DNA en la fase S (33,34). El marcaje con sondas de ADN centromérico y telomérico en los *buds*, realizado en cultivo de linfocitos humanos, muestra la predominancia de secuencias de DNA que no corresponden al centrómero y telómero, contrariamente a lo observado en los micronúcleos (21). Los mecanismos del proceso de brotamiento nuclear o "*budding*" por efecto del cromosoma VI no se conoce, sin embargo la evidente presencia de *buds* por efecto del dicromato de potasio, podrían ser indicios de un proceso apoptótico (35,36). Existen estudios en otras especies, de la inducción de apoptosis después de la exposición al dicromato de potasio, relacionado con las alteraciones del potencial de membrana de las mitocondrias, el incremento de la actividad del citocromo c y de la proteína p53, cambios asociados al incremento de las especies de oxígeno reactivo (ROS) generado por el dicromato de potasio durante el proceso de reducción de cromosoma VI a cromosoma III (37,38).

En la figura 4, se propone probables mecanismos sobre el origen de *nuclear buds* y micronúcleos. En principio, la inducción del daño genético por el cromosoma VI debe haber ocurrido en el centro hematopoyético de los individuos, en los peces teleosteos, el riñón cefálico es el principal

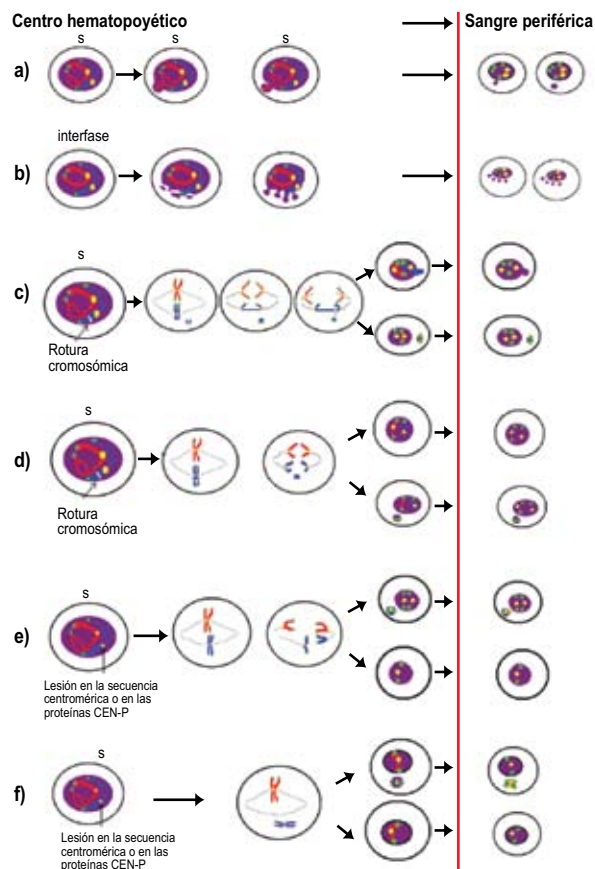


Figura 4. Mecanismos sobre el origen de *nuclear buds* y micronúcleos. Amarillo centrómero, verde telómeros.

Origen inicial del daño genético en interfase, principalmente fase S. **a)** Amplificación génica, **b)** Inicios de apoptosis celular, **c)** Roturas cromosómicas que conducen la formación de puentes anafásicos con pérdida de fragmentos cromosómicos, posterior a una segunda rotura por efecto de la tracción durante la segregación cromosómica puede quedar rezagado el cromosoma y no ser incluido totalmente y en consecuencia la formación de *buds*, **d)** rotura cromosómica en interfase y la micronucleación después de la división celular del fragmento acéntrico rezagado, **e)** y **f)** Alteración en la secuencia centromérica o a nivel de genes codificantes de proteínas CEN-P en interfase conducentes a la exclusión de una cromátida (**e**) o un cromosoma completo con sus dos cromátidas (**f**) y la micronucleación luego de la cariocinesis.

órgano hematopoyético (39). Una célula en fase S, es el blanco principal de cualquier agente genotóxico, por estar la cromatina descondensada para los procesos de replicación y transcripción.

Se ha descrito una explicación del brotamiento nuclear (*budding*) por efecto de una hiperamplificación del DNA en la fase S (33-35) o por efecto de una respuesta fisiológica celular como consecuencia de una poliploidización que tiende a eliminar el exceso de DNA con la formación de *buds*, seguido de micronúcleos o minicélulas (Figura 4a) (40).

Una hipótesis contraria se representa en la figura 4b, con la formación de *buds* o micronúcleos como consecuencia de un proceso apoptótico ante el daño provocado por agentes genotóxicos. Existe evidencias de la hipodiploidización celular o disminución del contenido de DNA por efecto del cromo VI, cuyo mecanismo no está esclarecido, estudios en ratas muestran el contenido hipodiploide del DNA en las células después de la exposición al cromo VI y explican su origen debido a la fragmentación del DNA asociado con eventos de apoptosis⁽³⁸⁾ y en otras investigaciones se le atribuye a un mecanismo aneugénico⁽⁴¹⁾. En numerosas publicaciones se notifica el efecto apoptótico del cromo hexavalente⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Otros mecanismos, consideran que la formación de *nuclear buds* es resultado de roturas de puentes anafásicos, o de cromosomas con migración retrasada que no son incluidos totalmente en el núcleo principal, propuestas representadas en la Fig.4c y que estarían sustentadas por la presencia de centrómero o telómero positivo en los *buds*⁽²⁷⁾.

En relación con el proceso de micronucleación, el origen de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, se debería a la ocurrencia de lesiones en el DNA principalmente en las células en interfase-S, por ejemplo (1) roturas en los brazos cromosómicos que conducirían a deleciones en el proceso anafásico, quedando rezagados fragmentos cromosómicos acéntricos con la consecuente formación de micronúcleos telómeros positivos (Figura 4c), (2) roturas cromosómicas en los telómeros conducirían a la formación de puentes cromosómicos durante la anafase-telofase que al producirse roturas generarían micronúcleos (Figura 4d), (3) cambios en las secuencias nucleotídicas de DNA centromérico o en las secuencias génicas de proteínas centroméricas y durante la migración cromosómica originarían cromosomas rezagados y micronúcleos de cromosomas enteros con una o dos cromátidas (Figuras 4e y f), (4) alteraciones en las secuencias génicas de enzimas comprometidas con la condensación cromosómica produciendo cromosomas pegajosos que no facilitan una segregación cromosómica equitativa que podrían formar micronúcleos o minicélulas.

Por otro lado, las lesiones que conducen a la micronucleación pueden ocurrir también durante la división celular, como resultado de la interacción de los metales con proteínas motor del citoesqueleto, como la tubulina y kinesina que conllevan a la formación de micronúcleos aneugénicos⁽⁴⁵⁾.

Los esquemas presentados se fundamentan en los estudios realizados por investigadores que explican

los mecanismos de micronucleación. Además de los citados anteriormente, los micronúcleos surgirían por amplificación génica y eliminados vía *nuclear budding* durante la fase S del ciclo celular⁽⁴⁶⁾, así mismo, se sostiene que otra causa de micronucleación se debería a la hipometilación de la heterocromatina y el silenciamiento de genes comprometidos con la condensación de la cromatina⁽⁴⁷⁾. Otras contribuciones proponen que la mayoría de micronúcleos parecen ser derivadas de cromátidas rezagadas⁽⁴⁸⁾. Cuando utilizaron el inductor 1-4 dioxane se registró aproximadamente el 90% de los micronúcleos CREST-negativo indicando que los micronúcleos fueron formados a partir de roturas cromosómicas, en contraste a estos resultados, cuando el inductor fue vinblastine, la mayoría (80%) de eritrocitos micronucleados fueron CREST-positivo, los micronúcleos estarían formados por cromosomas completos (eventos aneugénicos)⁽⁴⁹⁾. Resultados opuestos que indican efecto dependiente del tipo de genotóxico utilizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldbohm RA, Tielemans ELJP, Heederik D, Rubingh CM, Dekkers S, Willems MI, et al. Risk estimation for carcinogens based on epidemiological data: A structured approach, illustrated by an example on chromium. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 44(3): 294-310.
2. Holmes AL, Wise SS, Sandwick SJ, Wise JP. The clastogenic effects of chronic exposure to particulate and soluble Cr(VI) in human lung cells. *Mutat Res.* 2006; 610(1-2): 8-13.
3. Shtiza A, Swennen R, Tashko A. Chromium and nickel distribution in soils, active river, overbank sediments and dust around the Burrell chromium smelter (Albania). *J Geochem Explor.* 2005; 87(3): 92-108.
4. Krystek P, Ritsema R. Monitoring of chromium species and 11 selected metals in emission and immission of airborne environment. *Int J Mass Spectrom.* 2007; 265(1): 23-29.
5. Barceloux DG. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999; 37(2): 173-94.
6. Lees PS. Chromium and disease: review of epidemiologic studies with particular reference to etiologic information provided by measures of exposure. *Environ Health Perspect.* 1991; 92: 93-104.
7. Gómez V, Callao MP. Chromium determination and speciation since 2000. *Trends Analyt Chem.* 2006; 25(10): 1006-15.
8. Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 204(3): 274-308.
9. O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res.* 2003; 533(1-2): 3-36.
10. Messer J, Reynolds M, Stoddard L, Zhitkovich A. Causes of DNA single-strand breaks during reduction of chromate

- by glutathione in vitro and in cells. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(11): 1981-92.
11. **González Pérez Y, Aportela Gilling P.** Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología.* 2001; 1(1): 104-8.
 12. **Kharab P, Singh I.** Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat Res.* 1985; 155(3): 117-20.
 13. **de la Sierna E, Armiента MA, Gonsebatta ME.** Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Environ Pollut.* 2003; 126(3): 367-70.
 14. **Labra M, Bernasconi M, Grassi F, Mattia F, Sgorbati S, Airoldi R, et al.** Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat Bot.* 2007; 86(3): 229-35.
 15. **Devi KD, Rozati R, Saleha Banu B, Jamil K, Grover P.** In vivo genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(8): 859-65.
 16. **De Flora S, Iltcheva M, Balansky RM.** Oral chromium(VI) does not affect the frequency of micronuclei in hematopoietic cells of adult mice and of transplacentally exposed fetuses. *Mutat Res.* 2006; 610(1-2): 38-47.
 17. **Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH.** Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology.* 2006; 228(1): 16-23.
 18. **Schirmer K.** Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology.* 2006; 224(3):163-83.
 19. **Cavas T, Ergene-Gözükara S.** Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol.* 2005; 74(3): 264-71.
 20. **Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar LK, Hemminki K, Merlo F, et al.** IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res.* 2000; 463(2): 111-72.
 21. **Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GCM, Norppa H, et al.** Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* 2007; 617(1-2): 33-45.
 22. **Jaramillo N.** Estudio hematológico del puye (*Galaxias maculatus*) (Jenys,1842) en estado postlarval y adulto. [Tesis de Grado en Ciencias de la Acuicultura]. Temuco, Chile: Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco; 2005.
 23. **Röthmann C, Levinshal T, Timan B, Avtalion RR, Malik Z.** Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000; 125(1): 75-83.
 24. **Afonso EG, Silva Eda C, Tavares-Dias M, de Menezes GC, de Carvalho CS, Nunes Edad S, et al.** Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 147(2): 383-88.
 25. **Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE.** Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture.* 2006; 251(2-4): 596-602.
 26. **Cavas T, Ergene-Gözükara S.** Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res.* 2003; 538(1-2): 81-91.
 27. **Palhares D, Grisolia CK.** Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol.* 2002; 25(3): 281-84.
 28. **Grisolia CK, Torres-Cordeiro CM.** Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol.* 2000; 23(1): 235-39.
 29. **Torres deLemos C, Milan Rödel P, Regina Terra N, D'Avila de Oliveira NC, Erdtmann B.** River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007; 66(3):391-401.
 30. **Arkhipchuk VV, Garanko NN.** Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005; 62(1): 42-52.
 31. **De Campos Ventura B, De Franceschi de Angelis D, Marin-Morales MA.** Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pest Biochem Physiol.* 2008; 90(1): 42-51.
 32. **Da Silva-Souza,T, Fontanetti CS.** Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat Res.* 2006; 605(1-2): 87-93.
 33. **Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM.** Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.* 1998; 140(6): 1307-20.
 34. **Fenech M, Crott JW.** Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.* 2002; 504(1-2): 131-36.
 35. **Houle CD, Peddada SD, McAllister KA, Ward T, Malphurs J, Gersch WD, et al.** Mutant Brca2/p53 mice exhibit altered radiation responses in the developing mammary gland. *Exp Toxicol Pathol;* 2005; 57(2): 105-15.
 36. **Kuras M, Nowakowska J, Sliwinska E, Pilarski R, Ilasz R, Tykarska T, et al.** Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of Allium Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.)DC. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107(2): 211-21.
 37. **Kiechle FL, Zhang X.** Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2007; 326(1-2): 27-45.
 38. **Quinteros FA, Poliandri AH, Machiavelli LI, Cabilla JP, Duvilanski BH.** In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 218(1): 79-87.
 39. **Kobayashi I, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T.** Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. *Deve Comp Immunol.* 2007; 31(7): 696-707.

40. **Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA.** Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide 2007. *Pest Biochem Physiol.* 2007; 88(3): 252-59.

41. **Güerci A, Seoane A, Dulout FN.** Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutat Res.* 2000; 469(1): 35-40.

42. **Pulido MD, Parrish AR.** Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* 2003; 533(1-2): 227-41.

43. **Monaselidze J, Abuladze M, Asatiani N, Kiziria E, Barbakadze S, Majagaladze G, et al.** Characterization of chromium-induced apoptosis in cultured mammalian cells: A differential scanning calorimetry study. *Thermochim Acta.* 2006; 441(1): 8-15.

44. **Rudolf E, Cervinka M.** The role of intracellular zinc in chromium(VI)-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2006; 162(3): 212-27.

45. **Thier R, Bonacker D, Stoiber T, Böhc KJ, Wang M, Unger E, et al.** Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol Lett.* 2003; 140-141: 75-81.

46. **Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M.** Chromosomal changes: induction, detection

methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006; 88(11):1515-31.

47. **Fenech M.** Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 2006; 600(1-2): 58-66.

48. **Leach NT, Jackson-Cook C.** The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent in situ hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. *Mutat Res.* 2001; 495(1-2):11-19.

49. **Roy SK, Thilagar AK, Eastmond DA.** Chromosome breakage is primarily responsible for the micronuclei induced by 1,4-dioxane in the bone marrow and liver of young CD-1 mice. *Mutat Res.* 2005; 586(1): 28-37.

Correspondencia: Blga. Zulita Prieto. Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
Dirección: Calle San Mateo 300, Dpto. 202, San Andrés, Trujillo.
Teléfono: (51-44) 289075
Correo electrónico: zapl99@yahoo.com

Suscríbete en forma electrónica y gratuita a los contenidos de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, ingresa a www.ins.gob.pe, selecciona el icono de la revista y envíanos tus datos.