

Micronúcleos y anomalías nucleares en el Goodeido *Xenotoca melanosoma* del lago La Alberca en Michoacán, México.

Lola Paulina Flores-Kehn^{*}, José Luis Zavala-Aguirre¹, Héctor René Buena-Osben², María Luisa Ramos Ibarra³, Guillermo Zuñiga Gonzalez⁴, Tetsuya Ogura-Fujii⁵, Olivia Torres-Bugarín⁶.

¹Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, ²Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Michoacán, México, ³Facultad de Veterinaria, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México, ⁴Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS, Guadalajara, México, ⁵Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, ⁶Programa Internacional, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, México. Correo-e: lolapaulina@gmail.com

Resumen

En investigaciones previas se muestrearon 10 especies provenientes del lago La Alberca, Michoacán, México y se describió al pez Goodeido *Xenotoca melanosoma* como uno de los peces con mayor frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN), por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar a dicho pez como bioindicador de genotóxicos mediante la prueba de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN) en eritrocitos de sangre periférica. Para ello se expuso a este organismo por 24 o 96 horas a ciclofosfamida o colchicina, y se compararon los resultados con información de los peces colocados en campo y los mantenidos en cuarentena. Los resultados demuestran incremento de MN y AN (valores de p de 0.0513 a 0.0036) a concentraciones y tiempo dependientes, lo que apoya que el pez *X. melanosoma* es bioindicador de genotoxicidad y citotoxicidad, esto es de alta trascendencia para la evaluación de salud del ecosistema de la cuenca Lerma-Chapala.

Palabras claves: *Xenotoca melanosoma*; Bioindicador; Ciclofosfamida; Colchicina; Eritrocitos micronucleados; Anomalías nucleares eritocitarias.

Introducción

El uso de organismos como indicadores biológicos de la presencia de contaminantes es una alternativa confiable para la caracterización de los efectos de tóxicos en comunidades donde han alcanzado niveles críticos. De tal suerte que es fundamental la habilidad de predecir los efectos de los contaminantes en la comunidad para el manejo y restauración de ecosistemas (Cottingham 1999).

Frecuentemente se usan animales acuáticos en bioensayos para el monitoreo de calidad de agua, efluentes y agua superficial (Ali et al 2008) y los peces son candidatos perfectos para el estudio de posibles efectos mutagénicos y/o carcinógenos de distintos contaminantes que se encuentran en agua, ya que estos responden a tóxicos de manera similar a otros vertebrados, también pueden ser usados como tamiz de químicos con posible efecto teratogénico o carcinógenos en humanos y como modelo para determinar la distribución y efectos de contaminantes químicos en ambientes acuáticos (Al-Sabti & Metcalf 1995).

La prueba MN detecta efectos de sustancias mutagénicas en cromosomas a mediante de la identificación de fragmentos acéntricos o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo, por lo tanto permite identificar agentes clastógenicos y/o aneuploidógenos (Schmid 1975). Esta técnica se desarrollo inicialmente en eritrocitos de médula ósea de ratón pero se ha adaptando su aplicación a varias especies y tejidos (Zuñiga et al 1996, Zuñiga et al 2000, Zuñiga et al 2001^a, Zamora-Pérez *et al.* 2004), de ,manera particular Hooftman y Raat la modificaron para ser aplicada en peces y evaluar la exposición a sustancias carcinógenos y mutagénicas (Zhu et al. 2004). Por su parte, los peces son considerados como buenos bioindicadores porque dependen de varios eslabones de la cadena trófica y son capaces de acumular sustancias tóxicas y responden fácilmente a bajas concentraciones de agentes mutagénicos (Gustavino 2001). Por otro lado, hace poco se describieron diversa anormalidades nucleares eritrocitarias (AN) como un parámetro complementario de gentoxicidad (Serrano-García et al 2001).

Ciclofosfamida (CP) es un agente alcalino, que causa alcalinación en el anillo de purina, y esto resulta en una mala codificación y replicación de ADN, por esto es que en diversos bioensayos se usa para inducir MN *in vitro e in vitro*, e incluso como control positivo en pruebas *in vivo* de poca duración, por su parte la colchicina (COL) induce daño tubular, durante anafase impide formación de los microtúbulos por competición con la tubulina e induce que cromosomas completos queden fuera del núcleo (Zamora-Pérez 2004; Gustavino *et al.* 2001).

En un trabajo previo, se evaluó el número de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica de diez especies de peces mexicanos, y se encontró que el goodeido *Xenotoca melanosoma* presentaba los valores más altos. Aunado a esto, se detecto que tiene buena relación núcleo-citoplasma, su manutención en laboratorio es sencilla y es un organismo endémico de toda la cuenca Lerma Chapala y no esta en riesgo. Por todas estas razones es que se ha propuesto como candidato para ser un organismo bioindicador (Torres-Bugarin *et al.* 2007; Zavala-Aguirre *et al.* 2007). Por esto el objetivo de este trabajo fué evaluar la respuesta de *Xenotoca melanosoma* a la exposición al clastógeno CP y el aneuploidógeno COL y definir su potencial como organismo bioindicador mediante la prueba de MN.

Materiales y Métodos

Lugar de colecta: Los peces se colectaron del lago la Alberca el cual se localiza en la zona geotérmica de Los Negritos en la frontera este de Rift citala a 15 km al noreste de Jiquilipan Michoacán, México (Zárate del Valle y Simoneit 2005). Tiene una balance hidrológico bueno gracias a las aguas subterráneas encontradas en el lago. EL lago tiene una importancia económica baja, ya que solo se encuentran algunas áreas de agricultura extensiva, la pesquería es local, principalmente es un área de recreación. Antes de 1907 el lago fue considerado como parte del humedal de Chapala, después se separo por la construcción de la presa “Jamay- La Palma” que destino toda la parte este del humedal para desarrollo agrícola (Sandoval 1983). El aislamiento de este lago evito la contaminación del Rio Lerma y promovió la conservación de la ictiofauna endémica del humedal Lerma-Chapala (Álvarez del Villar 1970). **Colectas y mantenimiento:** Los organismos fueron colectados del lado norte del lago y en tiempo de secas, para la captura se uso una red de arrastre de 20 m de largo, 3.5 m ancho y apertura de 0.5 cm. Los organismos adultos de *X. melanosoma* se transportaron al laboratorio y se mantuvieron en peceras de 30 litros aprox. un pez/litro, se alimentaron con obleas de

Wardley ® aprox. 2% de su masa corporal, el agua fue preparada de acuerdo a parámetros establecidos por la OECD, debido a que el agua del lago presenta bajas concentraciones de cloro y ligera salinidad (Buelna-Osben 2002) se preparó agua artificial enriqueciéndolas con Sal Reef Azoo hasta alcanzar la salinidad similar al del lago 2.5 p.p.m. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones al menos tres semanas antes de comenzar con los análisis experimentales, durante este periodo el agua se mantuvo en filtración continua con filtros de arena y grava con bombas de aire, la evaporación fue compensada con agua destilada. **Diseño experimental:** Posterior a la aclimatación los organismos se separaron en 15 grupos en peceras de 10 l llenadas al 40 % de su capacidad. Cada pecera, con al menos seis peces pesados y medidos, para asegurar distribuciones similares de masa corporal y con el 50% de machos. Una vez iniciado la exposición se hizo cambio de agua diaria para evitar sedimentación del contaminante añadido. **Grupo 1:** Organismos muestreados en campo, **Grupo 2:** Control 24 h, **Grupo 3:** Control 96 h (grupos 1-3, no expuestos a genotóxico), **Grupo 4:** Expuesto a COL (Sigma) 0.285 mg/l / 24 h, **Grupo 5:** COL 0.516 mg/l/24 h, **Grupo 6:** COL 0.774 mg/l/24 h; **Grupo 7:** Expuesto a COL 0.285 mg/l / 96 h, **Grupo 8:** COL 0.516 mg/l/96 h, **Grupo 9:** COL 0.774 mg/l/96 h; **Grupo 10:** Expuesto a CP (Baxter) 25 mg/l/24h, **Grupo 11:** CP 50 mg/l / 24h, **Grupo 12:** CP 100 mg/l /24h, **Grupo 13:** CP 25 mg/l /96h, **Grupo 14:** CP 50 mg/l /96 h, y **Grupo 15:** CP 100/mg/l/96 h . (Rodríguez-Cea et al 2003). Se hizo cambio de agua diaria para evitar sedimentación del contaminante añadido. **Toma y procesamiento de muestras:** Las muestras se tomaron a las 0, 24 y 96h, tanto de los animales expuestos como de los no expuestos. Para ello se sacrificaron a los peces mediante un corte en la base de la aleta caudal (Hoofftman y de Raat 1982), previo a anestesiarlos con tricaine methanesulphonate (MS-222) por 10 minutos, los frotis se realizaron en portaobjetos, se dejaron y se fijaron con etanol al 80% durante 10 minutos. La tinción de las laminillas se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis del CIBO, IMSS con anaranjado de acridina específico para ácidos nucleicos. Este es un colorante de elección en la evaluación de biomonitores ya que identifica los MN de amarillo-limón al igual que el núcleo y el contenido de RNA de rojo, identificando los eritrocitos inmaduros (EPC) de los maduros (ENC) que se tiñen de verde opaco (Zúñiga-González *et al.* 2003). Las muestras se analizaron con microscopio de fluorescencia (marca Carl Zeiss Axiostar con lámpara de fluorescencia HBO 50 y fuente de poder mbq) con el objetivo de 100x (A-Plan) fluorescencia (100x). Se cuantificó: En 1,000 EPC: el número de: - Eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y/o con anormalidades nucleares (EPCAN); En 10,000 Eritrocitos totales (ET) el número de Eritrocitos micronucleados (EMN) y/o con anormalidades nucleares (EAN) así como la proporción de EPC en 1000 ET. **Consideraciones bioéticas:** Los animales fueron tratados de acuerdo a los requerimientos Institucionales y Gubernamentales de México e Instituciones de Salud de los Estados Unidos de Norte América (Poole y Robinson, 1994, Diario Oficial, 1999). **Análisis estadístico:** La comparación se analizó con Kruskal-Wallis y la prueba

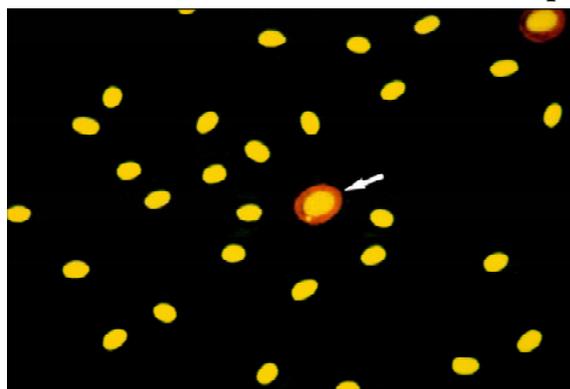


Figura I.

Eritrocito policromático micronucleado

Eritrocito policromático micronucleado

Conover (Conover 1980), para ello se uso Statgraphics Plus 5.0 Corp., USA con porcentaje de error de 0.5.

Resultados y Discusión

Los valores de la media y las desviaciones estándares de los diferentes grupos se pueden observar en el **Cuadro I**. Al analizar los resultados de las muestras de los peces muestreados en campo revelan que la concentración de contaminantes micronucleogénicos presente en el Lago La Alberca es bajo o al menos este pez de prueba no es capaz de detectarlos pues los valores son de EMN 3 en 10,000 células.

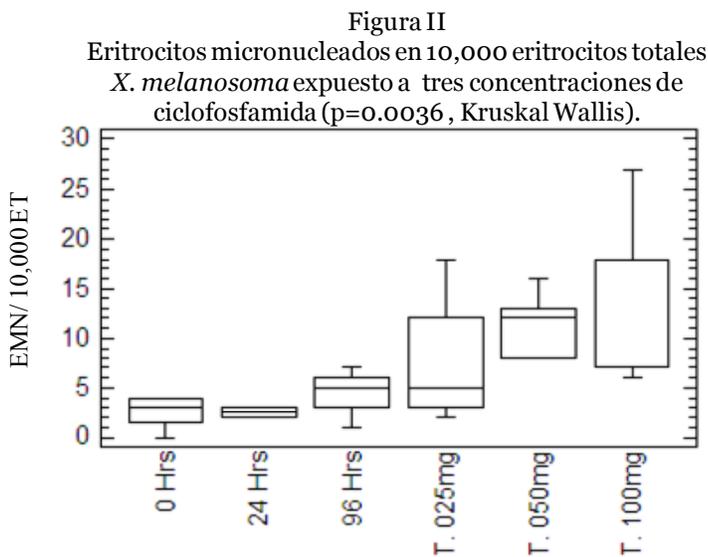
Cuadro I
Frecuencias de micronúcleos y anomalías nucleares eritrocitarias en *X. melanosoma* con y sin exposición a ciclofosfamida o colchicina.

Horas de exposición	mg/l	EPC 1,000 ET	EMN /10,000 ET	AN/ 10,000 ET	EPCMN /1,000 EPC	EPCAN /1,000 EPC
Campo	0	8.5±5.9 (10)	2.9±2.1 (23)	182.8±336.0 (6)	0.0±0.0 (9)	39.4±77.9 (4)
24 h	0	4.4±3.3 (5)	0.7±1.3 (13)	174.4±166.9 (5)	0.7±0.6 (3)	nd±nd (0)
96 h	0	4.0±4.3 (6)	0.7±0.8 (6)	61.2±46.3 (6)	0.5±0.7 (2)	10.0±2.8 (2)
COL 24 h	25	15.2±7.4 (4)	6.0±7.1 (5)	104.5±111.0 (4)	2.0±2.8 (4)	0.1±0.1 (2)
	50	7.8±8.7 (5)	11.4±3.4 (5)	194.4±100.2 (5)	1.6±1.7 (5)	15.0±13.0 (5)
	100	39.7±42.2 (6)	16.7±12.2 (6)	557.8±530.3 (6)	5.3±3.6 (6)	2.2±0.8 (3)
COL 96 h	25	2.6±3.6 (6)	6.8±6.0 (6)	497.5±361.1 (4)	0.0±0.0 (2)	0.4±0.4 (2)
	50	14.9±28.5 (4)	33.2±6.18 (4)	222.0±178.1 (4)	nd±nd (0)	nd±nd (0)
	100	7.8±8.2 (4)	9.8±4.9 (4)	272.0±359.5 (3)	nd±nd (0)	nd±nd (0)
CP 24 h	0.285	9.7±12.5 (6)	1.3±1.0 (6)	1012.5±1415.0 (6)	1.0 ± nd (1)	83.3±156.5 (6)
	0.516	6.3 ± 9.4 (6)	1.5 ± 1.4 (6)	1188.2 ± 591.2 (6)	2.0 ± nd (1)	90.7 ± 109.3 (3)
	0.774	18.8±11.8 (6)	2.0±1.4 (6)	333.5±267.1 (6)	1.0±1.7 (6)	40.2±36.0 (6)
CP 96 h	0.285	37.3 ± 38.6 (6)	5.7 ± 4.8 (6)	375.8 ± 332.8 (6)	2.4±3.0 (5)	54.0±51.4 (5)
	0.516	15.7 ± 16.7 (6)	2.5 ± 1.0 (6)	93.7 ± 35.5 (6)	5.0±6.1 (3)	8.0±8.1 (3)
	0.774	6.5 ± 7.9 (6)	4.4 ± 4.0 (6)	121.0 ± 68.9 (6)	1.5±0.7 (2)	13.0±14.1 (2)

Ciclofosfamida (CP) , Colchicina (Col); Eritrocitos policromáticos (EPC), Eritrocitos micronucleados (EMN); Anormalidades nucleares (AN), E ritrocitos totales (ET). Los datos representa media y desviación estándar, y tamaño de muestra.

Sin embargo, como se observa en el Cuadro I, cuando se expuso a *X. melanosoma* a genotóxicos como es la COL y CP, las frecuencias de EMN son muy incluso cerca de 40 EMN/10,000, lo que indica que de existir agentes micronucleogénicos en el Lago la concentración es muy baja o son especie específicos u órgano específicos. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las frecuencias de EMN y AN de los peces

de los diferentes grupos control (0, 24 y 96 h) ni con respecto a los valores obtenidos de los peces muestreados en campo. Tampoco se observó diferencia de EMN basales o inducidos en relación al sexo, distinto a lo descrito para otras especies (Hamada *et al.* 2003), por lo tanto los resultados fueron analizados independientemente del sexo. En cuanto a los grupos control se puede apreciar valores con alta variabilidad lo que podría explicarse por el origen silvestre de los organismos, ya que si bien se considero la masa corporal en el momento de la distribución de los organismo no fue posible considerar la edad y seguramente el sistema reticuloendotelial (responsable de remover eritrocitos anormales, viejos o con inclusiones) es mas eficiente conforme la edad aumenta como ocurre en otros vertebrados, información que concuerda con los hallazgos del Dr. Zúñiga quien trabajo con diversas especies también silvestres (Zúñiga et al 1996, 2000, 2001a, 2001b).

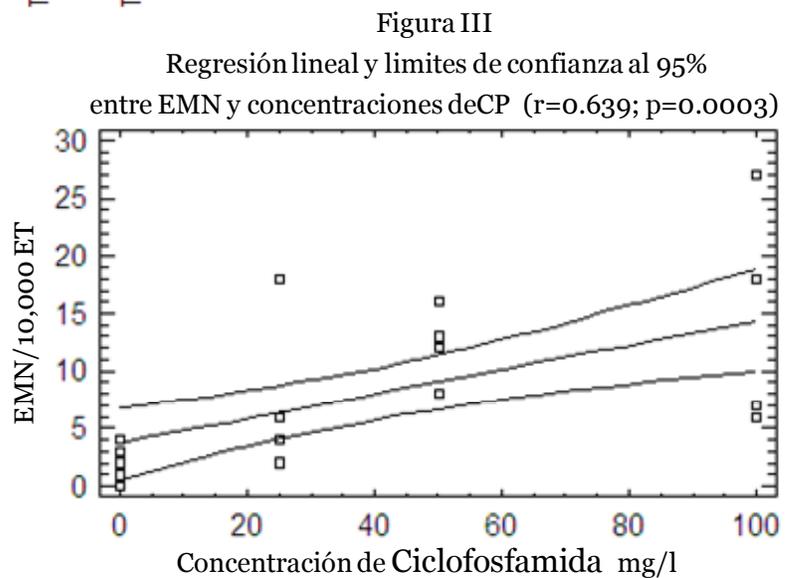


La regresión lineal también muestra incremento proporcional en la relación de EMN y concentración de CP ($r=0.6390$, $p=0.0003$, Figura III).

Al analizar los datos a las 96 h de exposición, no se identificó efecto micronucleogénico, ($p=0.0513$) debido a que ocurrió inhibición del sistema hematopoyético, como puede apreciarse en el Cuadro I al analizar la proporción de EPC ($p=0.4414$, $p=-0.1878$). Los EPC son indicador de la hematopoyesis y al disminuirse la producción es señal de citotoxicidad (Udroiu 2006, Zúñiga-González *et al.* 2001a).

Ciclofosfamida

Al utilizar la CP como agente inductor se garantiza el efecto clastógeno, esto se pudo observar a las 24 h de exposición (Figura II), ya que a mayor dosis de CP mayor es la frecuencia de EMN ($p=0.0036$), también esto se ve reflejado en la variabilidad de EMN en cada dosis aun en la mas baja, lo cual es una respuesta típica de un organismo al ser sometido a estrés (Forbes 1996).



Efectos en anomalías nucleares.

A las 24 h de exposición el análisis de la regresión entre AN y CP indica efecto directo ($r= 0.5628$, $p=0.0121$). Esta correlación se poya por la relación entre las AN y EMN ($r= 0.6072$, $p=0.0058$). a las 96 h el análisis de correlación entre AN y CP no se observó efecto ($r=0.0805$, $p=0.8035$), ya que también se ve afectado por la citotoxicidad de la CP.

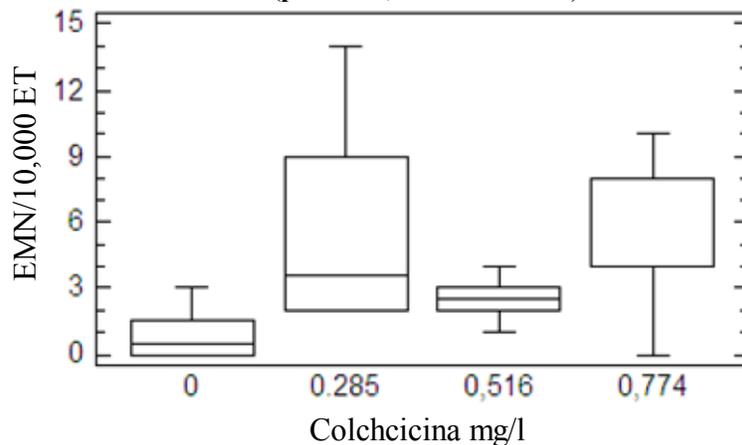
Colchicina

Al analizar el efecto clastógeno de la COL solo se observa tendencia al incremento ($p=0.0644$) en el caso de AN a concentraciones medias y altas. Estos resultados sugieren, la necesidad de una tiempo más prolongado de exposición con este compuesto, ya que los peces tienen una respuesta distinta a los mamíferos, como las ardillas (Udroiu 2006, Zúñiga-González *et al.* 2001b), y ratones, que demostraron una máxima de MN normalmente de uno a cinco días después de exposición (Al-Sabati y Metcalfe 1995), como ocurrió con la CP en nuestro estudio; en el caso de COL los efectos observados en la frecuencia de EMN a 96 h lleva a asumir que el incremento de MN se reflejaría hasta las 48 o 72 h, ya que a las 96 h el efecto genotóxico es franco tanto con la formación de MN ($p=0.0110$) como de AN (0.0287), resultados que concuerdan con el modelo establecido por Grisolia (Grisolia y Cordeiro 2000), así como con el de Bahari *et al.* (1994), quien describe en el pez gato *Clarias gariepinus* respuesta lineal de EMN dos a cuatro días después de los tratamientos de radiación gamma y mitomicina-C.

Entonces, si la acumulación de EMN y EPCMN son parámetros que están relacionados con genotoxicidad y la acumulación de EPCMN es debido al daño ocurrido durante las primeras 24-48 h después del tratamiento (Heddle *et al.* 1983) de tal manera que y las frecuencias de EPCMN permiten evaluar periodos cortos de exposición, se puede afirmar que el pez *X. melanosoma* es un organismo que permite evaluar la exposición aguda a genotóxicos como se observa en el cuadro I. Además, si las frecuencias de EMN que pueden ser útiles para evaluar una exposición crónica, entonces este organismo también puede ser utilizado para este tipo de bioensayos.

Por otro lado, en *X. melanosoma* las frecuencias de AN son considerablemente más altas que los EMN (Cuadro I), sugiriendo estas estructuras pueden reflejar un espectro más amplio del daño al ADN, información que concuerda con otros modelos como *Carassius auratus* (Cava *et al.* 2007), *Oreocromis niloticus* (Atsumoto *et al.* 2006), y el ave *Aratinga canicularis* (Gómez-Meda *et al.* 2006).

Figura IV
Eritrocitos micronucleados en 10,000 células
X. melanosoma expuesto a tres concentraciones de colchicina
($p=0.0110$, Kruskal Wallis)



Conclusiones

Los resultados preliminares presentado por nuestro equipo de trabajo (Torres-Bugarín 2007; Zavala-Aguirre 2007) sugiere potencialmente a *Xenotoca melanosoma* como organismo bioindicador debido a que este organismos presenta mayor numero de EMN que otras especies de peces de la misma localidad. El aislamiento del lago La Alberca de la cuenca Lerma altamente contaminada y la ausencia de aguas residuales o negras de la comunidad cercana de Villamar, también lleva a pensar que el agua del lago está libre de genotóxicos. Para poder verificar el potencial de esta especie silvestre como bioindicador hera necesario la exposición *in vitro* de inductores conocidos de gentoxicidad, con la prueba de MN. Los resultados demuestran que es un organismo que presenta una respuesta dependiente de concentraciones especificas de agentes clastogénicos y aneuploidógenos, por lo tanto *X. melanosoma* es un buen organismo para la evaluación de genotoxicidad en aguas continentales, específicamente de la cuenca Lerma-Chapala, sin embargo es necesario contar con mayor control del pez como es masa, talla, sexo, y edad, por lo que se sugiere que para futuros estudios se utilicen peces creados bajo condiciones controladas, además, si bien el pez no esta en riesgo si ayudaría a disminuir el impacto ecológico que se tiene al coleccionar organismos silvestres para pruebas de laboratorio.

Agradecimientos

Esta investigación es apoyada por el CNACyT, No. CB-06-59958; Los muestreos se llevaron a cabo con la licencia numero DGOPA.00142.140108.0086 y licencia para especies silvestres SGPA/DGVS/07234/07. Le agradecemos al Dr. Francisco W. Martínez Sandoval, director del “Programa Internacional de la Facultad de Medicina” y al Biol. David Ortiz Mendoza, director de la oficina de investigación de la UAG.

Bibliografía

- ∞ **Ali, F.K.; El-Shehawi, A.M.; Seehy, M.A.** 2008. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. African Journal of Biotechnology. 7 (5), 606-612.
- ∞ **Al-Sabati, K.; Metcalfe, C.D.** 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research. **343** (2-3), 121-135.
- ∞ **Álvarez del Villar, J.** Peces Mexicanos (Claves)1970. Comisión Nacional Consultiva de Pesca. Secretaría de Pesca, México. 132.
- ∞ **Atsumoto, S. T.; Mantovani, M.S.; Malagutti, M.I.; Ariza M.I. Dias A.L., Fonseca I.C., Marin-Morales M.A.** 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genet. Mol. Biol. **29**(1), 148-158.
- ∞ **Bahari, I.B.; Noor, F.M.; Daud, N.M.** 1994. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. Mutation Research. **313**(1),1-5.
- ∞ **Buelna-Osben, H.R.** 2002. Análisis de la estructura y dinámica de la comunidad de peces del lago “La Alberca”, Municipio de Villamar, Michoacán. CIIDIR- IPN-Michoacán. CGPI 20010359. Informe Técnico Final de Proyecto de Investigación. 36 pp.
- ∞ **Çava, T.; Könen, S.** 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis. 1-6.

- ∞ **Conover, W.J.** 1980. Some methods based on ranks. In *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd Ed.; John Wiley & Sons: New York, 229-237.
- ∞ **Cottingham, K.L.** 1999. Nutrients and zooplankton as multiple stressors of phytoplankton communities. Evidence from size structure. *Limnol. Oceanogr.* **44** (3 parte 2), 810-827.
- ∞ **Forbes, V.E.; Depledge, M.H.** 1996. Environmental stress and the distribution of traits within populations. In *Ecotoxicology: Ecological dimensions*, 1st Ed.; Baird, D.J.; Maltby, L.; Greig-Smith, P.W. Douben, P.E.T. Eds.; Chapman & Hall: London UK; 72-86.
- ∞ **Gómez-Meda, B.; Zamora-Perez, A.; Luna-Aguirre, J.; González-Rodríguez, A.; Ramos-Ibarra, M.L.; Torres-Bugarín, O.; Batista-González, C.; Zúñiga-González, G.** 2006. Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology.* **35**(3), 206-210.
- ∞ **Grisolia, C.K.; Cordeiro, C.M.T.** 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology.* **23** (1), 235-239.
- ∞ **Gustavino, B.; Scornajenghi, K.A.; Minissi, S.; Ciccotti, E.** 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research.* **494** (1), 151-159.
- ∞ **Hamada, S.; Nakajima, K.; Namiki, C.; Serikawa, T.; Hayashi, M.** 2003. Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat. *Environmental Mutagen Research.* **25** (1), 33-37.
- ∞ **Heddle, J.A.; Hite, M.; Kirthart, B.K.; Mavournin, J.T.; MacGregor, G.; Newell, W.; Salamone, M.F.** 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research.* **123**, 61-118.
- ∞ **Hoofman, R.N.; de Raat, W. K.** 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mud minnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research.* **104** (1-3), 147-152.
- ∞ **Organization for Economic Cooperation and Development.** 1992. Guideline for testing of chemicals. Guideline 203. Fish, Acute Toxicity Test. Paris, France.
- ∞ **Poole y Robinson, 1994, Diario Oficial, 1999.**
- ∞ **Sandoval, F. P.** 1981. Obras Sucesos y Fantasías en el Lago de Chapala. Gobierno de Jalisco. Secretaría General. Unidad Editorial. Colección Textos Jalisco, Serie: Estudios e Inversión (15), 77.
- ∞ **Schmid, W.** 1975. The micronucleus tests. *Mutation Research.* **31**, 9-15.
- ∞ **Serrano-García, L.; Montero-Montoya, R.** 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* **38**, 38-45.
- ∞ **Torres-Bugarin, O.; Ventura-Aguilar, A.; Zamora-Perez, A.; Gómez-Meda, B.C.; Ramos-Ibarra, M.L.; Morgan-Villela, G.; Gutiérrez-Franco, A.; Zúñiga-González, G.** 2003. Evaluation of cisplatin +5-FU, Carboplatin +5FU, and ifosfamida + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the bucal mucosa. *Mutation Research.* **539** (1-2), 177- 186.
- ∞ **Torres-Bugarín, O.; Zavala-Aguirre, J.L.; Gomez-Rubio, P.; Buelna-Osben, H.R.; Zúñiga-González, G.; García-Ulloa-Gómez, M.** 2007. Especies de peces con potencial como bioindicadoras de genotoxicidad en el lago “La Alberca”, Michoacán, México, *Hidrobiológica.* **17** (1), 73-79.
- ∞ **Udroiu, I. Review.** 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology.* **79**, 201-204.
- ∞ **Zamora-Perez, A.L.; Zúñiga-González, G.M.; Gómez-Meda, B.C.; Ramos-Ibarra, M.L.; Torres-Bugarín, O.** 2004. Induction of micronucleated cells in the shed skin of

salamanders (*Ambystoma* sp.) treated with colchicine or cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **44** (5), 436-40.

- ∞ **Zárate del Valle, P.; Simoneit, B.R.T.** 2005. La generación de petróleo hidrotermal en sedimentos del Lago Chapala y su relación con la actividad geotérmica del rift Citla en el estado de Jalisco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. **22**(3), 358-370.
- ∞ **Zavala-Aguirre, J.L.; Torres-Bugarín, O.; Zamora-Perez, A.L.** 2007. Aquatic Ecotoxicology Approaches in Western México. *Journal of Environmental Science and Health part A*. **42**(10), 503-1511.
- ∞ **Zhu, Y.; Wang, J.; Bai, Y.; Zhang, R.** 2004. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **72** (1), 78-86.
- ∞ **Zúñiga-González, G.; Torres-Bugarín, O.; et al Ramírez-Muñoz, M.P.; Ramos, A.; Fanti-Rodríguez, E.; Portilla, E.; García-Martínez, D.; Cantú, J.M.; Gallegos-Arreola, M.P.; Sánchez-Corona, J.** 1996. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*. **369** (1-2),123-127.
- ∞ **Zúñiga-González, G.; Torres-Bugarín, O.; et al.** 2000. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research*. **467** (1), 99-103.
- ∞ **Zúñiga-González, G.; Torres-Bugarín, O.; et al** 2001a. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. **494**(1),161-167.
- ∞ **Zúñiga-González, G.; Torres-Bugarín, O.; et al.** 2001b. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen*. **37**(2),173-177.
- ∞ **Zúñiga-González, G.; Gómez-Meda, B.C.; et al.** 2003. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* . **42** (4), 306-310.

