

Riesgo genotoxicológico en poblaciones de vicuñas (*Vicugna vicugna*) expuestas a minería aurífera

INFORME DE RESULTADOS PRELIMINARES

Lic. Liz Helen Romero Patzi

Antecedentes

La vicuña (*Vicugna vicugna*) es el camélido silvestre más pequeño entre los camélidos sudamericanos cuya fibra es considerada una de las más finas del mundo (Castillo 2009, MMAyA 2012, Grigione *et al.* 2018). La caza ilegal para uso de su fibra llevó a la especie al borde de la extinción, sin embargo, se logró recuperar sus poblaciones gracias a acciones conjuntas entre Argentina, Bolivia, Chile y Perú (Acebes *et al.* 2018, Grigione *et al.* 2018). Esto ha permitido el aprovechamiento de la fibra producto de la esquila de individuos mantenidos en silvestría, generando ingresos para las comunidades indígenas (MMAyA 2012, Grigione *et al.* 2018, UNEP-WCMC 2021). Actualmente los mayores riesgos que enfrenta la especie tienen relación con la degradación de hábitat, a consecuencia de la contaminación por actividades mineras.

Las actividades mineras legales e ilegales en Bolivia han aumentado exponencialmente en los últimos años (Bocángel 2007, Rodríguez *et al.* 2020) y el ANMIN Apolobamba es una región importante para la minería aurífera (Acosta *et al.* 2011). Este incremento en las actividades mineras implica un aumento de la contaminación que provocan, principalmente por el tipo de minería, con técnicas de amalgamación con mercurio (Enríquez 2001, Acosta *et al.* 2011, MMAyA 2016, Beltrán-Saavedra *et al.* 2020). Los residuos de esta minería contienen altos niveles de mercurio, los cuales se desechan al ambiente llegando a contaminar suelos, agua y aire (Gaona 2004, Huanqui 2018), que al contacto con la fauna y los humanos provoca daños a su salud (Mendoza-García *et al.* 2008, Poulin y Gibb 2008, Gaona 2014, Rodríguez 2017, Huanqui 2018).

En este sentido, las técnicas de análisis de riesgo genotoxicológico permiten conocer el nivel de daño en el ADN nuclear de los individuos analizados, con lo cual se pueden conocer los efectos que están teniendo los contaminantes producto de la minería, previo a que aparezcan afecciones visibles (Zalacain *et al.* 2005, Holland *et al.* 2008, Cedano *et al.* 2012, Torrez-Bugarín y Ramos-Ibarra 2013, Torrez-Bugarín *et al.* 2018).

Conocer los efectos de la contaminación minera en la salud animal, en especial en poblaciones de especies que están bajo protección y tienen importancia económica como la vicuña, permitirá tomar acciones para asegurar su conservación, y dará indicios de la salud del ecosistema y de posibles riesgos para la salud humana. En este sentido, el objetivo del presente trabajo es evaluar el riesgo genotoxicológico en poblaciones de vicuñas (*Vicugna vicugna*) expuestas a diferentes niveles de minería aurífera.

Métodos

Toma y procesamiento de muestras

La toma de muestras de las vicuñas se realizó en 13 comunidades del ANMIN Apolobamba al mismo tiempo de su captura para la esquila y monitoreo de su salud. Se

realizó el análisis de micronúcleos y anomalías nucleares en dos tipos de muestras celulares:

- **Muestras de mucosa bucal**

Se tomaron muestras al menos de 10 individuos por comunidad manejadora de vicuña de acuerdo a Holland *et al.* (2008), modificando el tipo de tinción: Para tomar las muestras de mucosa bucal se raspó suavemente la mucosa del revestimiento interno de una o ambas mejillas usando un hisopo. Estas muestras se conservaron en solución salina (0,9%) hasta su análisis en laboratorio. En laboratorio las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por siete minutos dos veces, desechando el sobrenadante y agregando solución salina, para separar las células de algunos residuos de alimento. A continuación, las células fueron transferidas a portaobjetos (25 x 75 mm), dos por individuo muestreado, mediante goteo y posterior extendido, se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente las placas fueron teñidas utilizando el Kit de panóptico, dejándolas secar a temperatura ambiente.

- **Muestras de Sangre**

Dada la dificultad que se tiene en la toma de muestras sanguíneas, por la rapidez con la que se realiza la esquila, y para evitar provocar mucho estrés en las vicuñas, se planteó tomar muestras de 60 individuos en seis comunidades manejadoras de vicuña de distintos niveles de minería (20 por nivel) (Tabla 1), sin embargo, fue posible tomar muestras sanguíneas de casi todas las comunidades (Tabla 1). Se tomaron ~500 µl de sangre y estas muestras fueron depositadas en tubos eppendorf con EDTA y conservadas en frío para su traslado a laboratorio (Ferraro *et al.* 2004), posteriormente se siguió el método descrito en Noriega *et al.* (2005), modificando el tipo de tinción: Se tomó una pequeña gota de sangre total (2-3 mm), la cual se colocó en un portaobjetos limpio (25 x 75 mm) casi al extremo, con la ayuda de otro portaobjetos, dejando que la gota se extienda por capilaridad a lo ancho del portaobjeto deslizador, se realizó un frotis de la sangre. Procurando que el extendido sea de tal grosor que las células sanguíneas no se sobrepongan ni que queden muy separados. Se prepararon dos placas por individuo muestreado. Las placas se secaron a temperatura ambiente por un día y posteriormente fueron teñidas utilizando el Kit de tinción panóptico, dejándolas secar al aire a temperatura ambiente.

Análisis de micronúcleos y anomalías nucleares

Los portaobjetos preparados se observaron bajo el microscopio compuesto a un aumento de 100 x. Se contabilizaron 1000 células bucales y células sanguíneas respectivamente por individuo (Zalacain *et al.* 2005, Torrez-Bugarín y Ramos-Ibarra 2013). La frecuencia de micronúcleos observada en ambos tipos celulares se calculó según la siguiente fórmula (Drumond *et al.* 2012):

$$MN(\%) = \frac{\text{Número de células con MN}}{1000} \times 100$$

El análisis de anomalías nucleares complementa al análisis de micronúcleos, por lo que éstas fueron observadas a la par con los micronúcleos. En células bucales se buscó la presencia de núcleos lobulados, puentes, núcleos alargados, núcleos arriñonados, muescas, constricciones, células binucleadas, en profase y en apoptosis (Torrez-Bugarín y Ramos-Ibarra 2013). En células sanguíneas se buscó la presencia de núcleos en forma arriñonada, circular, de herradura, pesa, irregulares, con puentes, fusión, brotes, cola, células binucleadas, en apoptosis y en necrosis (Takeichi *et al.* 2006, George *et al.* 2014, Fenech *et al.* 2016, Tian *et al.* 2016, Kravtsov *et al.* 2017, Vidya *et al.* 2017, Nersesyan *et al.* 2022). La frecuencia de Anormalidades Nucleares fue calculada con la siguiente formula (Drumond *et al.* 2012):

$$AN(\%) = \frac{\text{Número de células con AN}}{1000} \times 100$$

Resultados preliminares

Entre septiembre y noviembre del 2021 se realizó el muestreo en 13 de las 15 comunidades planteadas, no se pudo obtener muestras de Cotapampa ni de Medallani. La cantidad de muestras por tipo celular está en la tabla 1:

Tabla 1. Número de muestras planteadas versus número de muestras obtenidas en cada comunidad.

Nivel de actividad minera	Comunidad manejadora de vicuña	Cantidades planteadas		Muestras obtenidas	
		Sangre	Bucales	Sangre	Bucales
Muy alto	Amarka		10	10	10
	Puyo Puyo*	10	10	25	22
	Ulla Ulla		10	10	12
	Ucha Ucha		10	12	12
	Hichocollo		10	20	20
	Plan Aeropuerto		10	22	20
	Nubepampa*	10	10	22	22
	Huacochani		10	26	26
Medio	Chari*	10	10	10	10
	Cotapampa		0	0	0
	Marka Cololo*	10	10	20	22
Bajo	Hilo Hilo		10	10	15
	Apacheta*	10	10	20	20
	Cañuhuma*	10	10	31	31
	Medallani		0	0	0

Se realizaron dos placas por individuo por cada tipo celular, sin embargo, en algunos de los casos fue necesario realizar más placas para completar al conteo de 1000 células por individuo (tabla 2).

Debido a la posibilidad de necesitar datos para reportar resultados preliminares, se fueron leyendo placas de 5 individuos por comunidad, se tienen hasta el momento datos de células bucales de las 13 comunidades, aunque 4 de éstas necesitan que se completen las 1000 células para algunos de los individuos, y datos de células sanguíneas para 7 comunidades (Tabla 2, Anexo 1).

Tabla 2. Número de placas leídas

Comunidad manejadora de vicuña	Individuos	Placas leídas		
		Bucales	Con menos de 1000 cell	Sangre
Amarka	5	9	4	5
Puyo Puyo	5	13	0	5
Ulla Ulla	5	6	0	5
Ucha Ucha	5	5	0	5
Hichocollo	5	5	0	5
Plan Aeropuerto	5	5	0	
Nubepampa	5	5	0	
Huacochani	5	7	1	
Chari	7	11	2	5
Marka Cololo	5	5	0	
Hilo Hilo	5	8	2	5
Apacheta	5	5	0	
Cañuhuma	5	5	0	

Se realizó un análisis preliminar MANOVA seguido de un test T2 Hotelling, para comparar la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares para ambos tipos celulares entre los niveles de minería, el sexo y la edad de las vicuñas. Para las células sanguíneas, se pudo ver que existe diferencia significativa entre los niveles de minería (Lamba de Wilks = 0,607, $gl_1= 4$, $gl_2= 56$, $P < 0,01$) y entre el sexo (Lamba de Wilks = 0,698, $gl_1= 2$, $gl_2= 27$, $P < 0,01$) (Fig. 1), pero no entre las edades (Fig. 2). Además, la diferencia entre los niveles alto y bajo es significativa ($F = 10,346$, $gl_1 = 2$, $gl_2 = 27$, $P = 0.014$), pero no entre el nivel alto y medio ni entre el nivel medio y bajo (Fig. 1). En cuanto a las anomalías nucleares, no se vieron diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig. 3 y 4).

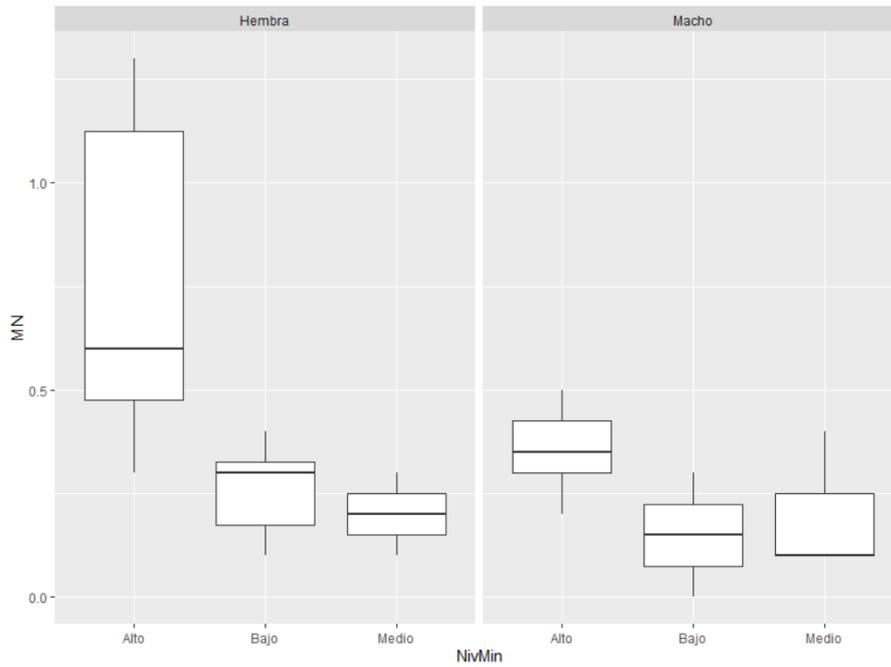


Figura 1. Variación de la frecuencia de micronúcleos (MN) de células sanguíneas entre sexos y tres niveles de minería (NivMin).

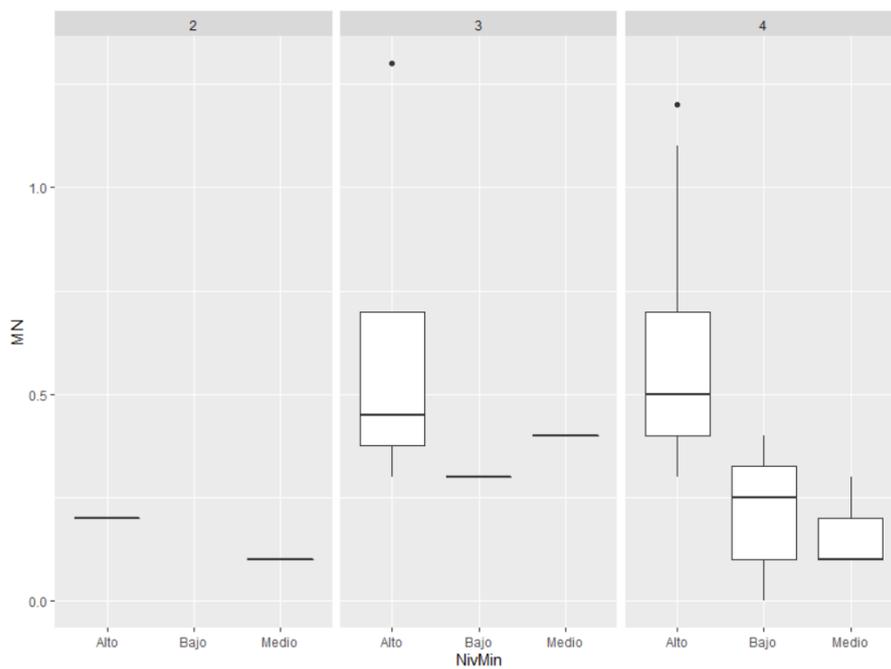


Figura 2. Variación de la frecuencia de micronúcleos de células sanguíneas (MN) entre las edades y tres niveles de minería (NivMin).

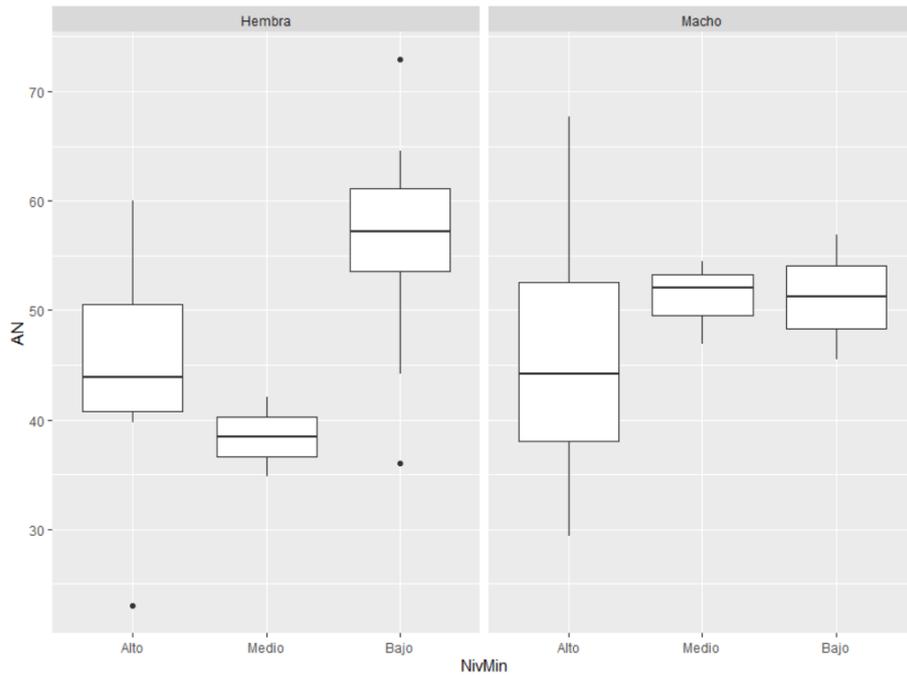


Figura 3. Variación de la frecuencia de anomalías nucleares (AN) de células sanguíneas entre sexos y tres niveles de minería (NivMin).

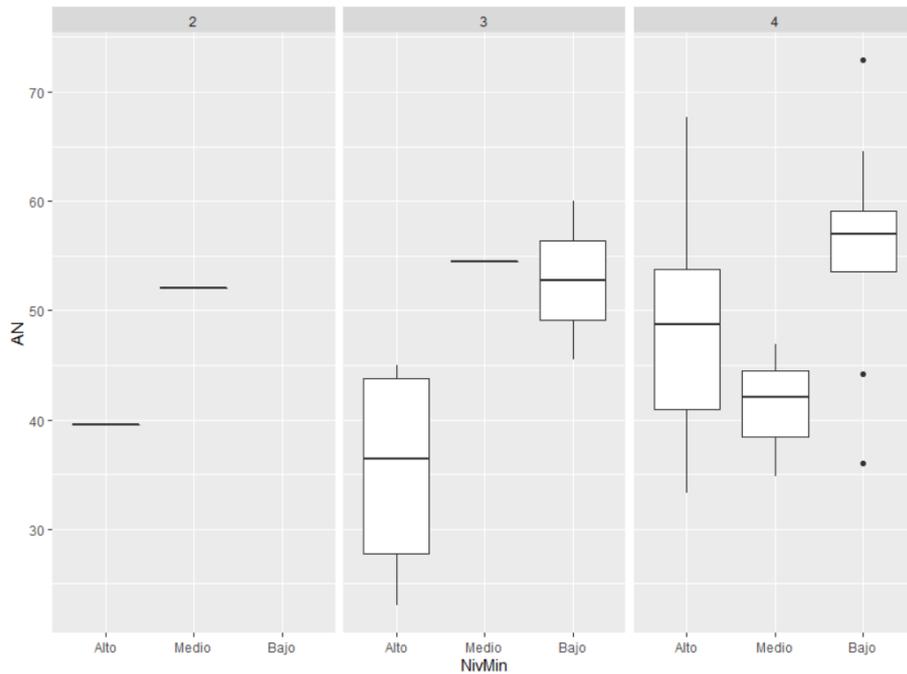


Figura 4. Variación de la frecuencia de anomalías nucleares (AN) de células sanguíneas entre las edades y tres niveles de minería (NivMin).

Para las células bucales, se pudo ver que no existe diferencia significativa entre los niveles de minería, el sexo, ni las edades (Fig. 5 y 6). En cuanto a las anomalías nucleares, no se vieron diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig. 7 y 8).

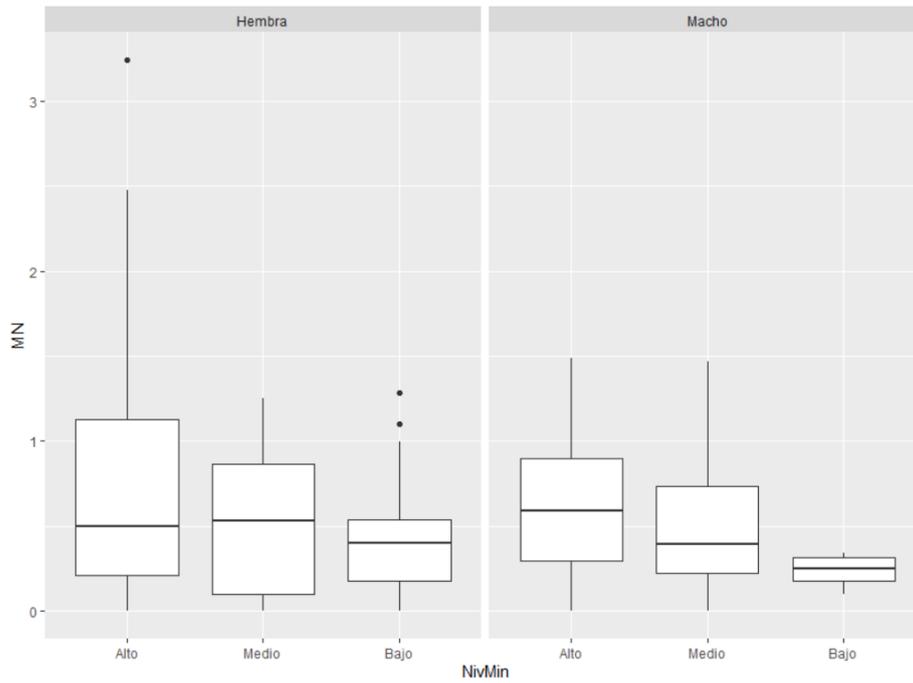


Figura 5. Variación de la frecuencia de micronúcleos (MN) de células bucales entre sexos y tres niveles de minería (NivMin).

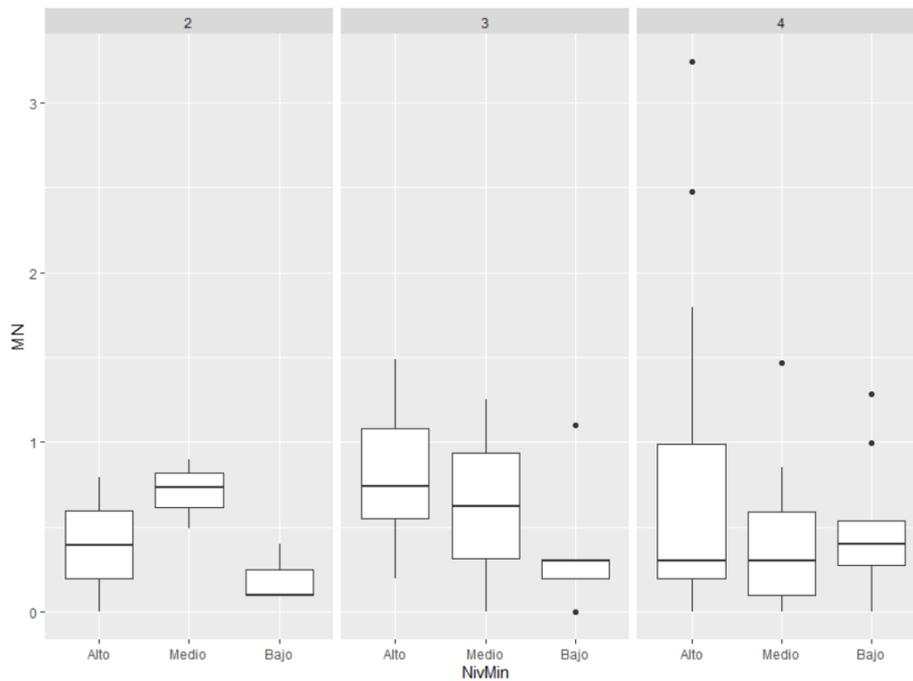


Figura 6. Variación de la frecuencia de micronúcleos (MN) de células bucales entre las edades y tres niveles de minería (NivMin).

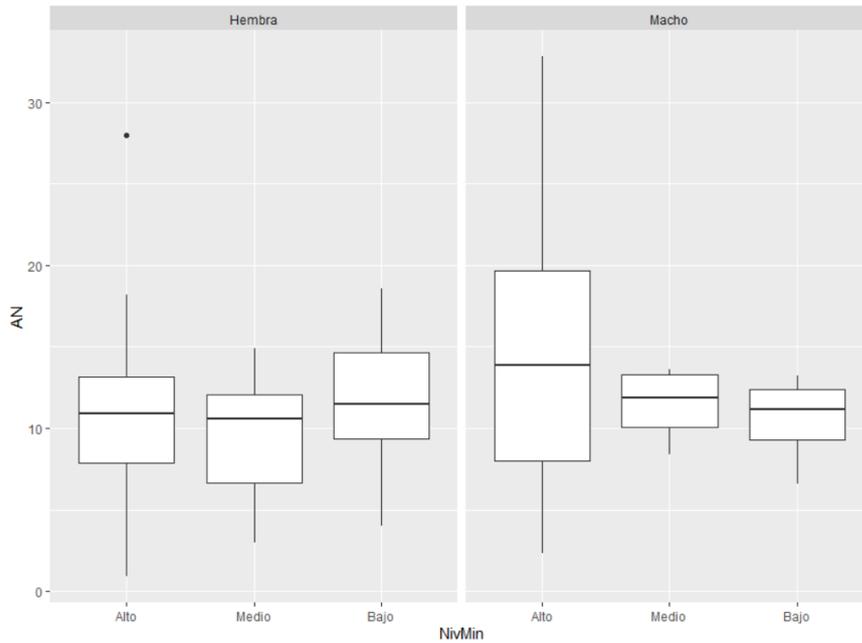


Figura 7. Variación de la frecuencia de anomalías nucleares (AN) de células bucales entre sexos y tres niveles de minería (NivMin).

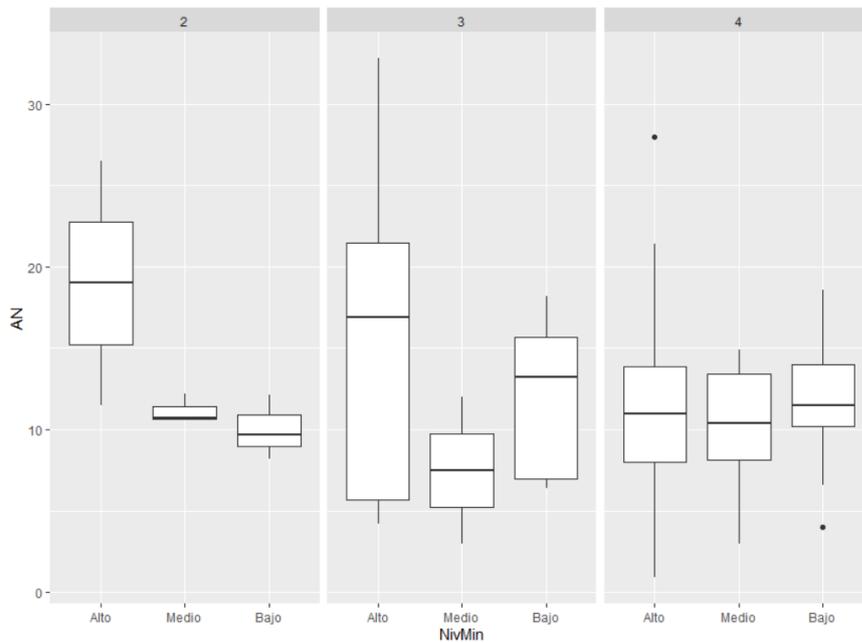


Figura 8. Variación de la frecuencia de anomalías nucleares (AN) de células bucales entre las edades y tres niveles de minería (NivMin).

En cuanto a la comparación entre las células, se realizó un análisis MANOVA preliminar entre los individuos que tienen la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares de ambos tipos celulares. Se observa que, tanto en micronúcleos como en anomalías nucleares existe diferencia significativa entre ambos tipos celulares (Lamba de Wilks = 0.203, $g11= 2$, $g12= 59$, $P < 0,001$). Siendo mayor la frecuencia de micronúcleos en células bucales (Fig. 9) y mayor la frecuencia de anomalías nucleares en células sanguíneas (Fig. 10).

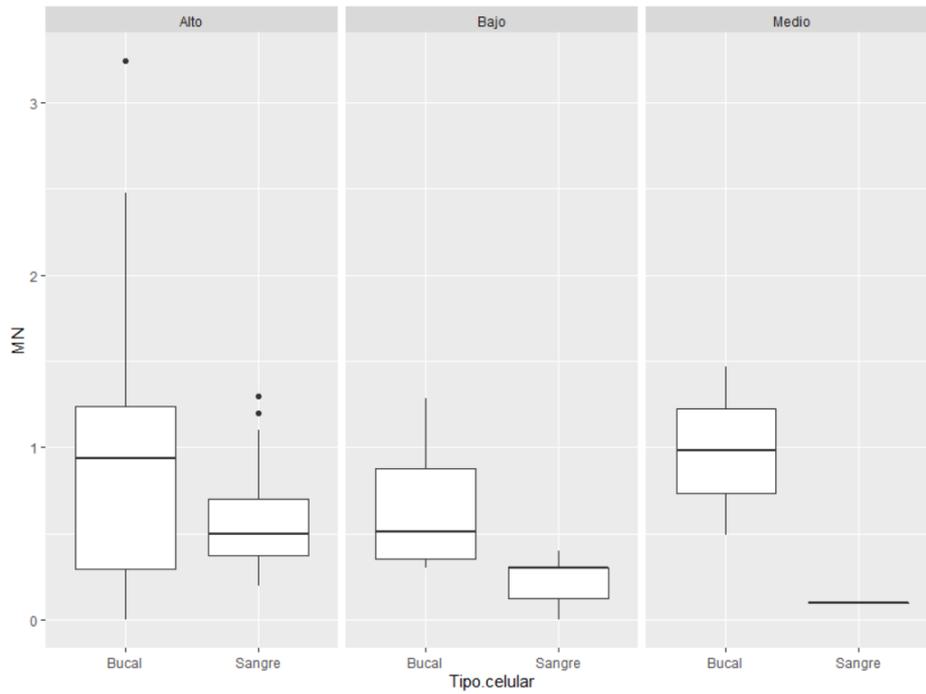


Figura 9. Frecuencia de micronúcleos entre tipos celulares: células bucales (Bucal) y células sanguíneas (Sangre).

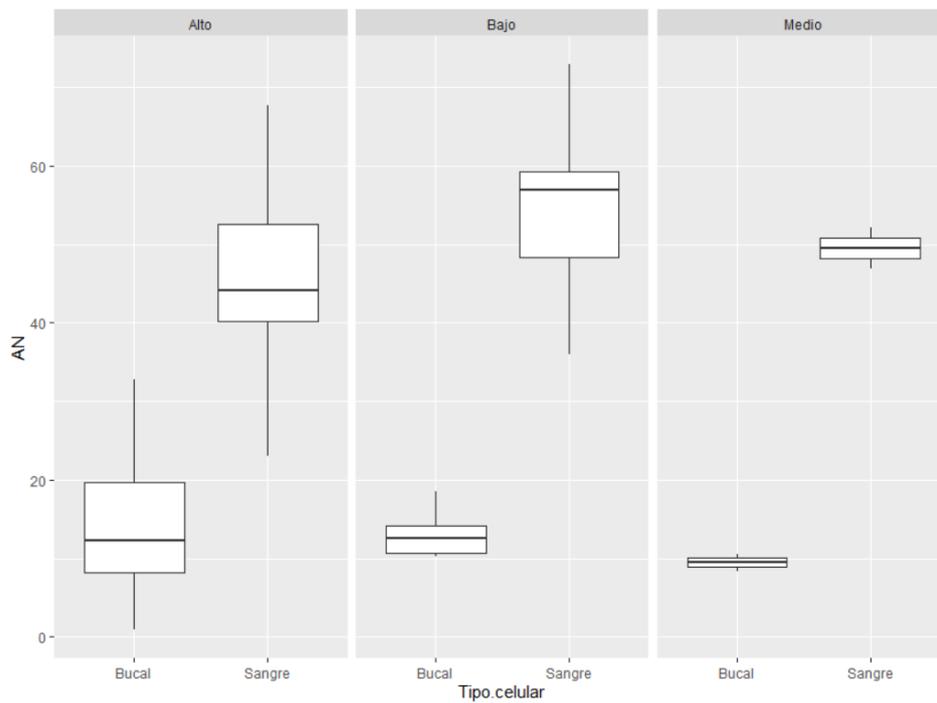


Figura 10. Frecuencia de micronúcleos entre tipos celulares: células bucales (Bucal) y células sanguíneas (Sangre).

Discusión

Los micronúcleos y las anomalías nucleares son biomarcadores de genotoxicidad y son manifestaciones de inestabilidad cromosómica como quiebres en el ADN reparados erróneamente, carencia de telómeros o telómeros disfuncionales, errores en la separación

de cromátidas hermanas entre otros, que frecuentemente terminan en cáncer (Fenech *et al.* 2010, Bonassi *et al.* 2011). Una alta frecuencia de micronúcleos o anomalías nucleares está relacionado con una sensibilidad mayor a mutágenos, y esta sensibilidad se ha considerado como una medida directa de la susceptibilidad al cáncer (Bonassi *et al.* 2011). Estos daños en el ADN, pueden ser provocados por agentes exógenos, ajenos a la célula (Noriega *et al.* 2005, Holland *et al.* 2008, Cedano *et al.* 2012, Torrez-Bugarín *et al.* 2018), como el mercurio de los desechos mineros. En este estudio los resultados, a pesar de ser preliminares, muestran diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos entre los tres niveles de minería, donde las vicuñas del nivel de minería alto tienen una frecuencia de micronúcleos mayor, mostrando un claro efecto de ésta sobre la estabilidad del ADN.

Los agentes genotóxicos afectan con mayor frecuencia las células que proliferan rápidamente, como las células epiteliales y de la mucosa bucal, que son la primera barrera con las que los genotóxicos tienen contacto, además son un blanco preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos (Holland *et al.* 2008, Cedano *et al.* 2012, Díaz *et al.* 2013). Por otro lado, los agentes genotóxicos pueden ingresar al cuerpo por diferentes vías, principalmente por la respiración, por ingesta y por la piel (Fenech *et al.* 2016), a partir de ahí pueden transportarse al resto del cuerpo, y pueden llegar a sitios de hematopoyesis, como la médula ósea, donde pueden causar daño del genoma en las células madre y células precursoras de las que se extraen los linfocitos y se derivan los leucocitos (Odagiri *et al.* 1994). A medida que los genotóxicos recorren el cuerpo, pueden activarse o desintoxicarse por diferentes órganos y esto puede influir en el grado en que los linfocitos están expuestos al riesgo del daño del ADN inducido químicamente (Fenech *et al.* 2016).

En este estudio, los resultados preliminares muestran que existe diferencia significativa en la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares, siendo mayor la frecuencia de micronúcleos en células bucales (Fig. 9) y mayor la frecuencia de anomalías nucleares en células sanguíneas (Fig. 10). Por lo explicado anteriormente, las células bucales son la primera barrera frente a los agentes genotóxicos, por esta razón tiene sentido que éstas presenten mayor frecuencia de micronúcleos, además, la alta frecuencia de anomalías nucleares en células sanguíneas muestra la respuesta del organismo frente a los agentes genotóxicos, que podría desencadenar en enfermedades visibles como el cáncer.

Para poder confirmar estos resultados, es importante concluir el proceso de lectura de placas y realizar los análisis correspondientes, y así dará indicios de la salud del ecosistema y de posibles riesgos para la salud humana, para tomar las acciones correspondientes previo a que el problema se haga visible.

Bibliografía

Acebes, P., J. Wheeler, J. Baldo, P. Tuppia, G. Lichtenstein, D. Hoces & W.L. Franklin. 2018. Vicugna vicugna (errata version published in 2019). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22956A145360542.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22956A145360542.en>.

- Acosta, J. A., S. Martínez-Martínez, A. Faz, R. Millán, M.A. Muñoz, T. Terán & R. Vera. 2011. Characterization of the potential mercury contamination in the Apolobamba gold mining area, Bolivia. *Spanish journal of soil science* 1(1): 86-99.
- Beltrán-Saavedra, L.F., O. Loayza, M. Salinas, V. Albarracín, J. Chincheros-Paniagua, J.L. Mollericona, S.J. Rivera & R. Wallace. 2020. Mercurio total (THg) en vicuñas (*Vicugna vicugna*) en áreas mineras del noroeste del departamento de La Paz, Bolivia. *Mastozoología Neotropical* 27(1):177-181.
- Bocángel J., D. 2007. La gestión ambiental minera en Bolivia. *Revista virtual REDESMA*.
- Bonassi, S., R. El-Zein, C. Bolognesi & M. Fenech. 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1): 93-100.
- Castillo A., D. 2009. Distribución e impacto de los beneficios de la fibra de vicuña. Trabajo dirigido. Carrera de Ciencias Económicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Cedano, D.A., S. Martínez, F. Escalera, S. Salgado, F. Carrillo, H. Macías & B. Peña. 2012. La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico veterinario* 2(2): 43-54.
- Drumond, D.I., D.M. Cesar, D. de Oliveira & S.T. Matsumoto. 2012. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *Brazilian Journal of Biosciences* 10(2): 211-219.
- Enríquez, J.C. 2001. Minería, Minerales y Desarrollo Sustentable en Bolivia. La Paz. Bolivia: Servicios Ambientales.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M. and Natarajan, A. T. (2010) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26: 125–132.
- Fenech, M., S. Knasmueller, C. Bolognesi, S. Bonassi, N. Holland, L. Migliore, F. Palitti, A.T. Natarajan & M. Kirsch-Volders. 2016. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation research-reviews in mutation research* 770(Pt A): 12-25.
- Ferraro, M.V.M., A.S. Fenocchio, M.S. Mantovani, C. Ribeiro & M.M. Cestari. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology* 27(1): 103-107.

Gaona, X. 2004. El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. Tesis doctoral. Departamento de Química. Universidad autónoma de Barcelona, Barcelona. 246 p.

George, A. R. Dey, V. Bhuria, S. Banerjee, S. Ethirajan, A. Siluvaimuthu & R. Saraswathy. 2014. Nuclear anomalies, chromosomal aberrations and proliferation rates in cultured lymphocytes of head and neck cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(3): 1119-1123.

Grigione, M., L.F. Daugherty, R. List, J. Rushton & R. Sarno. 2018. The sustainability of vicuña conservation in Bolivia. pp. 183-205. En: Brinkmann, R. & S.J. Garren (eds.) *The Palgrave Handbook of Sustainability*. Palgrave Macmillan, Cham.

Holland, N., C. Bolognesi, M. Krisch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller & M. Fenech. 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research* 659: 93-108.

Huanqui, R. 2018. Determinación de metales pesados en pastos, fibra, carne y vísceras de alpacas en comunidades del distrito de Ananea-Puno. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Altiplano. Perú. 87 p.

Kravtsov, V. A. Livanova & Y. Starkova. 2017. Nuclear abnormalities of lymphocytes as the simplest markers for bioindication test in case of mass casualty events involving radiation exposure. *Emergency medicine*, 7: 4.

Mendoza-García, M.H., F. Soler-Rodríguez & M. Pérez-López. 2008. Los mamíferos salvajes terrestres como bioindicadores: nuevos avances en Ecotoxicología. *Observatorio Medio ambiental* 11: 37-62.

MMAyA. 2012. Estrategia del Programa Nacional para la Conservación y Manejo Sustentable de la Vicuña. Artes Gráficas Carrasco. La Paz. 63 p.

MMAyA- SERNAP. 2016. Plan de manejo, Área Natural de Manejo Integrado Nacional. Apolobamba 2016 – 2025: Parte I Diagnóstico y Caracterización. Centro de Estudios y Proyectos.

Nersesyan, A. M. Kundi, M. Fenech, H. Stopper, J. da Silva, C. Bolognesi, M. Misík & S. Knasmueller. 2022. Recommendations and quality criteria for micronucleus studies with humans. *Mutation research-reviews in mutation research* 789.

Noriega, B.R., E. Armienta, M.G. Chávez, E. Cervantes, L.E. Ojeda & I.Y. Quevedo. 2005. Valoración de genotoxicidad con determinación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos. *Boletín médico de la Facultad de Medicina UAS* 8(1): 13-17.

Odagiri Y., K. Takemoto & M. Fenech. 1994. Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone marrow cells in vitro following in vivo exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 24(1):61-7.

Poulin, J. & H. Gibb. 2008. Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. OMS, Serie Carga de Morbilidad Ambiental 16.

Rodríguez, D. 2017. Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN* 21(12): 3372.

Rodríguez L., F., G. Guzmán, B. de Marchi & D. Escalante. 2020. Efectos de la minería en el desarrollo económico, social y ambiental del Estado Plurinacional de Bolivia. Documentos de Proyectos, Santiago, Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).

Takeichi, N., M. Hoshi, S. Iida, K. Tanaka, Y. Harada, Z. Zhumadilov, N. Chaizhunusova, K.N. Apsalikov, Y. Noso, T. Inaba, K. Tanaka & S. Endo. 2006. Nuclear abnormalities in aspirated thyroid cells and chromosome aberrations in lymphocytes of residents near the emipalatinsk nuclear test site. *Journal of radiation research*, 47(supl. A): A171-A177.

Tian, X.L., H. Zhao, T.J. Cai, X. Lu, D.Q. Chen, S. Li & Q.J. Liu. 2016. Dose-effect relationships of nucleoplasmic bridges and complex nuclear anomalies in human peripheral lymphocytes exposed to ^{60}Co γ -rays at a relatively low dose. *Mutagenesis*, 31(4):425-31.

Torrez-Bugarín, O. & M.L. Ramos-Ibarra. 2013. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology* 31(2):650-657.

Torrez-Bugarín, O., C.S. Carrillo & J.A. Armijo. 2018. Evaluación de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica. *Ecología y salud* 59.

UNEP-WCMC (Comps.) 2021. Checklist of CITES species. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland and UNEP-WCMC, Cambridge, United Kingdom.

Vidya, P.V., A. George & K.C. Chitra. 2017. An *in vitro* study of the induction of micronuclei and other nuclear anomalies in peripheral blood lymphocyte culture by metal oxide nanoparticles. *International journal of advanced research in biological sciences*, 4(1):1-8.

Zalacain, M., L. Sierrasesúmaga & A. Patiño. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 28(2): 227-236.