

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN *Rattus norvegicus* CEPA HOLTZMAN POR EFECTO DE CLOROQUINA

Chromosomal alterations in Rattus norvegicus holtzman strain by chloroquine effect

María Cruz-Briceño¹, María Amésquita-Cárdenas¹, Jesús Pérez-Anticona², Guillermo Morillo-Zavaleta²

Área de Genética y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Trujillo-Perú¹, Estudiantes de la Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Trujillo-Perú²

RESUMEN

El presente trabajo evaluó el potencial genotóxico de cloroquina mediante la identificación y cuantificación de alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa holtzman. Los grupos de trabajo fueron: control negativo (suero salino fisiológico), control positivo (ciclofosfamida, 50 mg/Kg pc) y experimental (cloroquina, 300 mg/kg/pc). La administración fue vía oral durante 2 días. Se aisló la médula ósea y se procesó con la técnica de obtención de cromosomas. Se encontró: incremento significativo de las alteraciones cromosómicas en las células de las ratas tratadas con cloroquina (45 ± 5.2) y ciclofosfamida (153.5 ± 12.3) respecto al control negativo (4 ± 1.4). Entre las alteraciones cromosómicas encontradas están: Intercambio tri-radial, fragmento acéntrico y ruptura cromatídica. Se concluye que cloroquina incrementa significativamente las lesiones en el ADN de las células de médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman.

Palabras clave: Alteraciones Cromosómicas, Cloroquina, *Rattus norvegicus* Holtzman

ABSTRACT

The present tested Chloroquine genotoxic potential by identification and quantification of chromosomal alterations in bone marrow cells of *rattus norvegicus* holtzman strain. The working groups were: negative control (saline), positive control (cyclophosphamide, 50 mg/kg/bw) and experimental (Chloroquine, 300 mg/kg/bw). Oral administration lengths by 2 found a significant increase of chromosomal alterations in cells of specimens treated with chloroquine (45 ± 5.2) and cyclophosphamide (153.5 ± 12.3) compared to negative control (4 ± 1.4). Among chromosomal alterations found are: exchange tri-radial, acentric fragment and Chromatid break. This research concludes that Chloroquine significantly increases DNA damage in bone marrow cells of *Rattus norvegicus* holtzman strain.

Key words: Chromosomal alterations, Chloroquine, *Rattus norvegicus* Holtzman

Recibido: 01 de Octubre, 2014

Aceptado: 15 de Noviembre de 201

INTRODUCCIÓN

Los organismos están expuestos a mutaciones como resultado de las operaciones celulares normales o de alteraciones aleatorias con el ambiente; la frecuencia de mutaciones se puede aumentar por agentes mutagénicos biológicos, físicos y químicos, que directa o indirectamente ingresan al ser vivo, constituyendo un riesgo para su salud^{1,2}.

Los estudios de genotoxicidad constituyen un paso importante en la evaluación toxicológica de diversas sustancias químicas incluido los medicamentos, puesto que pueden alterar diferentes procesos celulares con interacciones directas DNA/droga que ocasionarían alteraciones genéticas, procesos teratogénicos y carcinogénicos^{3,4}. La evaluación genotóxica de los medicamentos ha permitido retirar a muchos productos del mercado, al balancear sus riesgos y beneficios⁵.

Entre los medicamentos que se han analizado, tenemos a cloroquina (CQ)^{6,7,8}, utilizada desde la segunda guerra mundial como antipalúdica^{9,10,11}; actualmente, esta se utiliza en tratamientos de: artritis reumatoide, síndrome de sjögren, lupus eritematoso sistémico y discoide^{12,13,14}, porfiria cutánea, urticaria solar¹⁵, osteoartritis erosiva¹⁶, conjuntivitis primaveral¹⁷, esplenomegalia¹⁸ y corea¹⁹. Recientemente Mucenic reportó el uso de cloroquina en paciente con problemas hepáticos autoinmunes²⁰.

La cloroquina se absorbe con rapidez y casi por completo en las vías gastrointestinal, intramuscular y subcutánea y se distribuye rápidamente en los tejidos metabolizándose y liberándose en forma lenta principalmente en la orina^{10,11,21}. El mecanismo de acción primario de la cloroquina, es la interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos, posiblemente por intercalación con el ADN del plasmidio; en la acción esquizotóxica se propone la alteración del tropismo de los lisosomas, inhibición de las proteínas calciodependientes; sin embargo los mecanismos de acción de la cloroquina son controversiales^{10,11}.

Dentro de los efectos secundarios de Cloroquina principalmente se encuentran los efectos tóxicos oculares,^{22,23,24,25,26} gastrointestinales, neuromusculares, disfunción vestibular; discrasias sanguíneas, alteraciones pigmentarias, toxicidad cardíaca^{10,16,27,28,29,30,31}. Asimismo se reporta ototoxicidad^{11,32,33} y ptosis bilateral³⁴. El comportamiento citotóxico de cloroquina, también se ha reportado en organismos acuáticos³⁵ y en *Drosophila melanogaster*³⁶.

Los efectos mutagénicos de Cloroquina no se han confirmado en células de linfoma en ratón, ni en ensayos de micronúcleos, por lo que, se afirma que el daño en poblaciones humanas tiene un riesgo mínimo al administrar estas drogas^{8,37,38,39}; sin embargo, Chatterjee⁴⁰, informa efecto genotóxico en salmonella y en ratones, asimismo, Grisolia⁴¹, afirma que cloroquina en asociación con NaNO₂ induce aberraciones cromosómicas; Ju y col⁴² y Snyder⁴ por otro lado reportan que cloroquina inhibe la actividad catalítica de la Topoisomerasa II y que este evento sería responsable de efecto clastogénico.

La toxicidad de cloroquina, su uso a largo plazo en el tratamiento de diferentes enfermedades, aumenta el riesgo de lesión de material genético, y, dada la vulnerabilidad de este, es imprescindible establecer o identificar su potencial actividad mutagénica en diferentes bioensayos y biomarcadores.

El uso de biomarcadores, permite determinar el riesgo potencial por efecto de un agente genotóxico, que a largo plazo conllevaría a desarrollar algún tipo de patología.

Actualmente existe disponibilidad de numerosos biomarcadores para evaluar los efectos genotóxicos, entre ellos los métodos citogenéticos que evalúan las alteraciones cromosómicas^{43,44,54,46}.

Por lo mencionado, el objetivo del presente estudio, es evaluar el potencial genotóxico de Cloroquina mediante la identificación y cuantificación de las alteraciones cromosómicas en las células de médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa holtzman.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se utilizó especímenes de *Rattus norvegicus* cepa holtzman de cría consanguínea de 6-8 semanas de nacidos y con peso promedio de 200 g., obtenidos del instituto Nacional de Salud Lima-Perú.

2. Material de prueba

Se utilizó cloroquina fosfato de 250 mg.

3. Mantenimiento de especímenes

Los especímenes se aclimataron durante una semana en el laboratorio de Genética, Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiental, luego se distribuyeron aleatoriamente y separados por grupos de tratamiento, en jaulas plásticas de 60x60x40 cm. La alimentación se realizó con ratonina peletizada y agua ad libitum.

4. Tratamiento y vía de administración

Los especímenes se distribuyeron en: un grupo control negativo (suero salino fisiológico), un grupo control positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg pc) y un grupo experimental tratado con cloroquina, la administración se realizó por vía oral con sonda nasogástrica en soluciones con suero salino fisiológico a razón de 300 mg/kg. De peso corporal, en dos aplicaciones separadas por 24 horas. La investigación se realizó siguiendo el diseño de estímulo creciente.

5. Obtención de preparados cromosómicos

Los especímenes fueron tratados con colchicina a razón 5 mg/Kg/pc por 120 minutos; posteriormente se sacrificaron y disectaron los fémures de cada espécimen para extraer la médula ósea. La muestra fue sometida a solución hipotónica de KCl 0,075 M, por 30 minutos; luego se resuspendió y centrifugó a 1000r.p.m. por 8 minutos; al término se eliminó el sobrenadante y se fijó con Carnoy por

15 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 800 r.p.m. por 8 minutos, eliminándose el sobrenadante se agregó 0,5 ml de fijador para obtener la suspensión celular con la cual se realizó el goteo en láminas porta objetos, se secaron a temperatura ambiente y colorearon con Giemsa 4%⁴⁷.

6. Análisis citogenético

Los preparados citológicos de cada uno de los tratamientos fueron analizados al microscopio óptico con aumento de 100X con la finalidad de identificar las placas metafísicas en las que se evaluaron cada uno de los cromosomas para detectar, cuantificar y fotografiar las alteraciones cromosómicas.

7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante las pruebas estadísticas de distribución de frecuencias y análisis de varianza, se determinó las diferencias significativas entre los tratamientos mediante el test de Kruskal-Wallis con una probabilidad de error de 0.05⁴⁸.

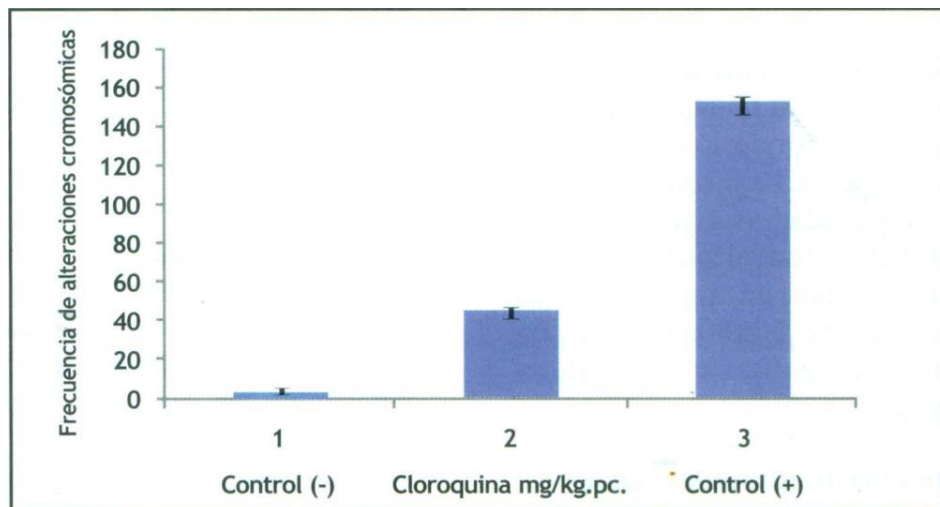
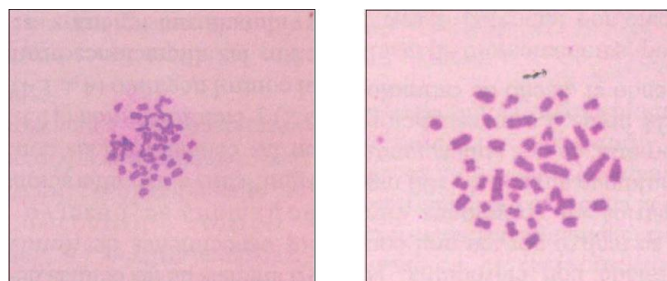
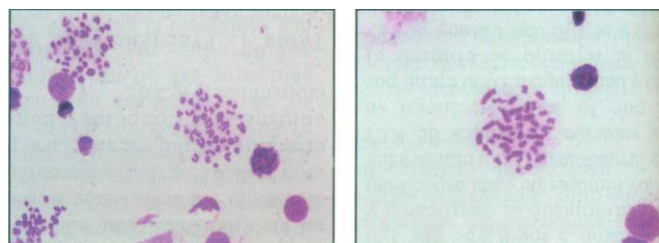
RESULTADOS

Al análisis de las células de la médula ósea de los especímenes de *Rattus norvegicus* cepa holtzman, se observó un incremento significativo de alteraciones cromosómicas en las células tratadas con cloroquina (45 ± 5.2) y ciclofosfamida (153.5 ± 12.3) respecto al control negativo (4 ± 1.4) (Tabla 1 y Fig 1), entre las alteraciones cromosómicas que se evidenciaron tenemos a: lesiones en las cromátidas y la subsiguiente recombinación entre dos o más cromosomas denominadas intercambios tri-radial (Fig. 2. A y b), lesiones en las cromátidas con mínima pérdida de alineación llamadas lesión acromática o gap cromatídico (Fig.2.c) y discontinuidad en las cromátidas que tiene clara pérdida de continuidad conocidas como ruptura cromatídica (fig. 2d).

Tabla 1. Frecuencia de alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de *Rattus norvegicus*

Grupos de trabajo	Frecuencia (%) de alteraciones cromosómicas (x ± DE)
Grupo control negativo	4 ± 1.4
Grupo experimental: Cloroquina 300 mg/kg pc	45 ± 5.2*
Grupo control positivo: Ciclofosfamida 50 mg/kg pc	153.5 ± 12.3*

*P ≤ 0.05

**Fig. 1.** Frecuencia de alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa holtzman expuestos a cloroquina.**Fig. 2.** Placas metafásicas de *Rattus norvegicus* cepa holtzman muestran alteraciones cromosómicas expuestos a cloroquina: a) y b).-intercambio tri-radial, c) lesión acromática o gap cromatídico y d). – ruptura cromatídica.**Fig. 3.** Placa Cromosómica normal de *Rattus norvegicus* cepa holtzman.

DISCUSIÓN

Los biomarcadores de genotoxicidad como el de las alteraciones cromosómicas sirven para valorar el daño potencial que ocasiona las sustancias en el material genético de los individuos expuestos. En la experiencia el efecto genotóxico de Cloroquina en *Rattus norvegicus* cepa holtzman se evidencia por la presencia quiebras o rupturas cromatídicas, intercambios triradiales y lesión acromática o gap cromatídico en las células de los especímenes que fueron expuestos (Fig. 2). Los intercambios triradiales resultan de la quiebra simultánea de dos o más cromosomas, tales quiebras pueden afectar a una sola cromatina o ambas cromáticas, lo cual conduciría a una desregulación de transcripción de genes afectando parcial o totalmente su función⁴⁹.

Las rupturas cromatídicas o cromosómicas (Fig. 2), son evidencia del efecto genotóxico de Cloroquina (CQ), ya que las alteraciones cromosómicas son consecuencias directa o indirecta del daño a nivel del ADN, así las rupturas cromosómicas como las encontradas en el presente estudio pueden resultar de lesiones en el ADN como producto de la oxidación de las purinas y pirimidinas inducida por la CQ⁵⁰, seguida de la no reparación^{51,52}. Asimismo, las rupturas cromosómicas pueden ocurrir como consecuencia de la acción de inhibidores de la Topoisomerasa II, tal es el caso de la cloroquina.

La Topoisomerasa es la enzima nuclear que interviene en los procesos de segregación cromosómica y en el relajamiento del estado topológico del ADN mediante cortes y religamientos, por lo cual la CQ como inhibidor de la Topoisomerasa II determinaría un aumento en el daño cromosómico en el grupo expuesto con respecto al control⁵³.

La presencia de alteraciones cromosómicas encontradas nos permite relacionar el mecanismo de acción de la droga que produce rupturas en el ADN con imposibilidad de la célula para reparar correctamente estos daños,

lo cual se tornaría irreversible por saturación en los daños en los sistemas de reparación del DNA y control del ciclo celular que a futuro podría ocasionar entre otras enfermedades el desarrollo de diversos tipos de cáncer⁵⁴.

CONCLUSIÓN

La cloroquina lesiona el ADN de las células de médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa holtzman conduciendo al aumento significativo de la frecuencia de alteraciones cromosómicas en los grupos experimentales respecto al grupo control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salamanca F. Citogenética Humana. México: Edit. Médica Panamericana; 1990.
2. Rabello-Gay MN, Rodrigues MA, Moneteleones NR, Mutagenése, carinogénesis e teratogénesis: métodos e criterios de evaluación. Rev. Brás. Genet; 1991; 246.
3. Betancourt BJ, Ramos RA, Bizoso PA, Decalo MM, Martínez MM, Edreira AA. Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides. Rev. Cubana Plant Med 1998; 3(2): 58-61.
4. Snyder RD. Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. Environ. And Mol. Mutagen. 2000; 35(1): 13-21.
5. Repetto Jimenez M y Repetto Kuhn G. Toxicología Fundamental. 4º edición Edit. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. España; 2009.
6. Arriaga AM, Espinosa AJ, Ramírez J, Cortinas de Nava C. Mutagenicity of urine from mice exposed orally to nitrite and various aminated antiparasitic drugs. Environ. And Mol. Mutagen 1989; 14: 13-19.
7. Ono-Ogata T, Tomoe O, Nishikawa M, Ohta T, Yamagata I. Mutagenic activity and mutational specificity of antiprotozoal drugs with and without nitrite treatment. Environ. and Mol. Mutagen. 2002; 39(1): 43-48.

8. Riccio ES, Lee OS, Winegar RA, Krogstad DJ, De D, Mirsalis JC. Genet toxicology testing of the antimalarial drugs chloroquine and a new analog. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 38(1): 69-79.
9. Socarrás FB, Fonte GL, Inclán VG, Lorigados PL, Cruz SC, Finaly VC: Efecto de la dosis profiláctica de cloroquina sobre la expresión de receptores Fc de neutrófilos. *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. Hemoter*. 1989; 5(3): 419-426.
10. Velasco MA, Lorenzo FP, Serrano MJ, Andres Trelles F. *Farmacología*. 16^a ed. New York: Interamericana McGraw-Hill; 1993.
11. Katzung BG. *Farmacología Básica y Clínica*. 8^a ed. México: El Manual Moderno; 2002.
12. Duran CC, Caracho WF, Berrón PR, Tamayo de Malo L, Carranza JS. Lupus eritematoso de inicio infantil con manifestaciones de lupus profundo y alteraciones de la función pulmonar. *Acta pediátr. Mex*. 1993; 14(2): 86-89.
13. Kasserman MW, Silva FA, Muhelen Ca, Guimaraes I, Franck M, Serafini MC, Chloroquine rheumatology: uso and after effects in rheumatology. *Rev. Cient. AMECS* 1993; 2(1): 24-25.
14. Quintal AM, Blanco FF, Bravo OJ, Daza BL, Lavalle MC, Baca RV. Retinopatía Secundaria a la administración de cloroquina en pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes. *Bol. Méd. Hosp. Infant*. 1995; 52(1): 29-33.
15. Wolff FC, Armas MR, Krause YP, Parraguez AA, Soto JR. Tratamiento de la porfiritia cutánea tarda con cloroquina y su efecto sobre la hepatopatía asociada: análisis retrospectivo. *Rev. Méd. Chile*. 1996; 124(4): 456-460.
16. Hamdam PC, Oliveira RL, Salgado MC, Lima MB, Rozental D, Dancout MA, Sion M, Silva MM, CarrilloAL, Almeida LO. Tretament of erosive osteoarthritis with phosphate of cloroquine. *An. Acad. Nac. Me*; 2000. 160(1):12-16.
17. Prado SA, Tenorio G. Estudio comparativo de la eficacia de la cloroquina y el cromoglicato de sodio en el tratamiento de la conjunctivitis primaverl. *Rev. Méd. Hosp. Gen. Mex*. 1994; 57(3): 119-124.
18. Espinal TC, Arias RA, Rodríguez GC, Martínez DM. Síndrome de esplenomegalia tropical: presentación del primer caso confirmado en Colombia. *Biomédica (Bogotá)*. 1983; 3(1/2): 26-30.
19. Gorodesky M, Buendia A. Corea y Cloroquina. Un nuevo tratamiento para un antiguo mal. *Arch Inst Cardiol. Mex*. 1981; 51(6): 555-557.
20. Mucenic M, Nello ES, Cancado EL. Chloroquine for the maintenance of remission of autoimmune hepatitis: results of a pilot study. *Arq. Gastroenterol*, 2005; 42(4): 249-255.
21. Braunwald E, Hurer S, Fauci SL, Llango D, Kasper D, Jmeson L. *Principios de Medicina Interna*. Vol 1. 15^a ed. Madrid. Mc Graw Hill 2003.
22. Wagner I, Andrade M, Atorre L, Zerbini C. Retinopathy in patients using chloroquine diphosphate en rheumatoid arthritis. *Rev. bras. reumatol*. 2001. 41(1). 53-58.
23. Browning DJ. Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy: screening for drug oxicity. *Am j. Ophthalmol* 2002; 133(5): 649-656.
24. Brunton LL, Lazo JS, Parker JK, Goodman Gilman's *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*- 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
25. Graña GJ, Cabana VM, Vasquez GA, Sánchez MM. Toxicidad ocular por antimaláricos. *An. Méd. Interna*. 2002; 19(4): 189-191.
26. Inada E, Watanabe KP, Tanaka SG, Sakakisbara LA. Toxicidad ocular causada por cloroquina: relato de un caso. *Arq. Brás. Oftalmol*. 2005; 68(3): 407-409.
27. Figueiredo MC, Atherino CC, Monteiro CV, Levy RA. Antimalárico e ototoxicidade. *Rev. Bras. Reumatol*. 2004; 44(3): 212-214.
28. Carneiro CS. Tratamento da malária por plasmodium falciparum com cloroquina e quinina: Estudo da cardiotoxicidade y resposta terapéutica. *Rev. Patol. Trop*. 1985; 14(1): 39-129.
29. Silveira HE, Cuadros OF, Maito FL, Giordani S. Hiperpigmentaciõ da mucosa bucal causada

- pelo uso prolongado de fármaco antimalárico. Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre. 2003; 44(1): 26-38.
30. Rey LD, Berneck A, Goncalves L, Silva MB; Skare TL, Silva JA. Prolongamento do intervalo QT do electrocardiograma em pacientes reumáticos usando antimaláricos. Rev. Bras. Reumatol. 2003; 43(5): 275-278.
31. Texteira RA, Martinelli FM, Benvenuti LA, Costa R, Pedrosa AA, Nishioka AS. Cardiac damage from chronic use of chloroquine: a case report and review of the literatura. Arq. Bras. Cardiol. 2002; 79(1): 85-88.
32. Bettini SM, Mena HC, Concha SF. Intoxicación por cloroquina. Pediatr. Día. 20003; 19(5): 47-49.
33. Cecatto SB, Garcia RI, Costa KS, Anti SM, Longone E, Rapoport PB. Perda auditiva sensoriaoneural no lupus eritematoso sistémico: relato de três casos. Rev. Brás. Otorrinolaringol. 2004; 70.
34. Bedu-Addo G. Chloroquine-induced bilateral ptosis. Trans R Soc Trop Med Hyg; 2006; 100(7): 696-697.
35. Zurita JL, Jos A, Del Peso A, Salguero M, López—rtíguez M, Repetto G. Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. Aquat. Toxicol. 2005; 75(2): 97-107.
36. Xanema N, Creus A, Velásquez A, Marcos R. Testing of chloroquines and quinacrine for mutagenicity in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res. 1985; 158(3): 177-180.
37. Obaseiki-Ebor EE, Obasi EE. Aspects of chloroquines mutagenicity. Mutat Res. 1986; 175(2): 51-59.
38. Thomas SM, Silburn KA, MacPhee DG. Frameshift mutagenesis by chloroquine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Mutat Res. 1987; 192(4): 233-237.
39. Espinosa-Aguirre JJ, Aroumir C, Meza MT, Cienfuegos E, Cortinas de Nava C. Genotoxicity of amedicide and anthelmintic drugs in *Escherichia coli* pol A+/pol A-. Mutat Res 1987; 188(2): 111-120.
40. Chatterjee T, Mukhopadhyay A, Khan KA, Giri AK. Comparative mutagenic and genotóxica effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquines. Mutagenesis. 1998; 13(6): 619-624.
41. Grisolia CK, Takahashi CS. Assesment of interactions of the antimalarial drugs chloroquine and mefloquine with NANO₂ and HgCl₂ in rodents. Mutat Res. 1994; 305(2): 151-156.
42. Ju R, Mao Y, Glick MJ, Muller MT, Snyder RD. Catalytic inhibition of DNA topoisomerase II α by sodium azide. Toxicological letters. 2001; 121: 119-116.
43. Cuenca P, Ramírez V. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. Rev. De biología tropical Costa Rica. 2004. 50(2).
44. Lerda DR, Masiero B. Estudio citogenéticop, Bioquímico y de la función reproductora en personas expuestas a plaguicidas. Acta Bioquim. Clin. Latinoam. 1990. 24(3): 247-255.
45. Ramos A, Edreira A, Villescusa A, Vizozo A, Martínez M. Evaluación genotóxica de un extracto acuoso de Aloe vere L. Rev. Cuba. Plantas Med; 1996; 1(2): 18-23.
46. Ramos A, Villascusa A, Vizozo A. Ausencia de genotoxicidad en extractos fluidos de *Ortociphon aristatus* blume (Te de riñon) y *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo). Rev. Cuba. Plantas Med 1996. 1(2): 38-43.
47. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel 2009; 25(3): 22-38.
48. Ross Sheldon M. Introducción a la estadística. Edit. Reverte. 2007.
49. Higinio Me Silva A. Alteracoes cromossômicas causadas pela radiacao dos monitores de video de computadores. Rev. Saúde Pública. 2002. 36(3).
50. Farombi EO. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. Cell Biol Toxicol; 2006 May; 22(3): 159-167.

51. Mateuca R., Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006, Doi: 10.1016/j.biochi.2006.07.004.
52. Galeano L.; Guevara G. Alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por bioflavonoides de la dieta en linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev. Cienc. Salud. Bogota.* 2007. 5(2): 26-36.
53. Snyder RD. Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. *Environ. And Mol. Mutagen.* 2000. 35(1): 13-21.
54. Acarrunz ME, Tirado N, Gonzáles AR, Cuti M, Cervantes R, Huici O, Jors E. Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de caranavi, guanay, Palca y Mecapaca, Expuestos a plaguicidas. *Cuadernos del Hospital de Clínicas* 2006. 51(1): 7-18.