

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**GENOTOXICIDAD DE TRES CONCENTRACIONES DE
ACETAMINOFENO PARACETAMOL® EN CÉLULAS DE
MÉDULA ÓSEA DE *Mesocricetus auratus*.**

**Tesis para optar el Grado de Doctora en:
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Autor: MsC. MARÍA LETICIA AMÉSQUITA CÁRDENAS
Asesor: DR. RADIGUD FERNÁNDEZ ROMERO

TRUJILLO - PERU

2009

No de Registro:.....

DEL JURADO

Los profesores que suscriben, miembros del jurado examinador, declaran que la presente tesis ha sido ejecutada en concordancia con las normas vigentes de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo

Dr. Luis Concepción Urteaga

PRESIDENTE

Dr. Luis Campos Reyna

SECRETARIO

Dr. Radigud Fernández Romero

MIEMBRO

PRESENTACIÓN

Señores Miembros del Jurado Dictaminador:

En cumplimiento a lo dispuesto en el reglamento de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo, para obtener el Grado de Doctor, me es honroso presentar y someter a vuestra consideración el informe de tesis titulado:

“Genotoxicidad de tres concentraciones de Acetaminofeno paracetamol[®] en células de médula ósea de *Mesocricetus auratus*”.

Con el cual pretendo obtener dicho Grado

Trujillo, Noviembre del 2009

MsC. María Leticia Amésquita C.

DEDICATORIA

*A DIOS NUESTRO SEÑOR, por ser el motor
que me anima y acompaña cada día de mi vida-*

*A mi madre, por su amor infinito
A mis hermanos, cuñados, sobrinos,
que con su apoyo y estímulo contribuyeron
al logro de mis objetivos*

*A LA MEMORIA DE MI TIO MANUEL,
Por haber cultivado en mí ese tesón de superación*

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de la Universidad Nacional de Trujillo, por brindarme el apoyo económico para realizar los estudios de doctorado.

A mi asesor el Dr. RADIGUD FERNANDEZ ROMERO, expreso mi profundo agradecimiento, por sus consejos y enseñanzas que me sirven siempre de ejemplo y por guiarme en la realización de la tesis.

A mis profesores, Dra. Zulita Prieto Lara, MsC. Edgardo Polo Benítez, por su afecto, amistad y apoyo incondicional, puesto que, siempre están dispuestos a brindarme sus conocimientos y experiencias como investigadores.

A mis colegas MsC. María Cruz Briceño y Blgo. Julio León Incio, por su amistad, afecto y colaboración desinteresada en la realización de esta tesis.

A todos mis familiares y amigos, mi más sincera gratitud.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar el daño genotóxico de tres concentraciones del Acetaminofeno paracetamol[®] en células de médula ósea de *Mesocricetus auratus*. Se estableció cinco grupos a los que se les administró, suero salino fisiológico (control negativo), 50 mg/kg/pc. de ciclofosfamida (control positivo) y 125, 500, 1000 mg/kg/pc. de paracetamol[®] diariamente vía oral por 10 días. Al día siguiente de la última administración, se aisló médula ósea y se procesó con la técnica del test de micronúcleos, obtención de cromosomas y con la tinción de regiones organizadoras del nucleolo (AgNOR).

Se observó, un incremento significativo de micronúcleos (MN) en las diferentes concentraciones de acetaminofeno ($17.95 \pm 2.71^*$, $22.32 \pm 1.01^*$, $26.33 \pm 1.08^*$) y ciclofosfamida ($27.22 \pm 3.703^*$), respecto al grupo control negativo ($0.71 \pm 0.028^*$). Así mismo, se observó, variación en el número y tamaño de los micronúcleos presentes en los eritrocitos policromáticos.

Respecto a las alteraciones cromosómicas, se observó un incremento significativo en las diferentes concentraciones de acetaminofeno ($25.33 \pm 4.04^*$, $31.0 \pm 1.0^*$ y $36.33 \pm 0.58^*$) y ciclofosfamida ($45.66 \pm 7.37^*$) respecto al control negativo (1.66 ± 0.58); también, se observó intercambio tri-radial y rearrreglos complejos, ruptura cromatídica con fragmento acéntrico en las diferentes concentraciones de acetaminofeno paracetamol[®] y control positivo más no en el control negativo.

Al evaluar la morfología de las regiones nucleolares en células de médula ósea de *M. auratus* se encontró diferencias estadísticamente significativa entre áreas de AgNOR/célula que van entre $3.37 \pm 0.56^*$; $2.38 \pm 0.82^*$; $3.95 \pm 1.02^*$ y $3.03 \pm 0.63^* \mu\text{m}^2$ para concentraciones de acetaminofeno y ciclofosfamida respectivamente, en relación a las células del grupo control negativo ($1.74 \pm 0.35^*$); de manera general las células tratadas con paracetamol[®] también inducen a AgNOR pleomórficos.

Se concluye que el Acetaminofeno paracetamol[®] produce un aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos, cromosomas con rupturas cromatídicas y variaciones morfométricas en las regiones AgNOR del nucleolo en células de médula ósea de *M. auratus*.

Palabras claves: Micronúcleos, Acetaminofeno, paracetamol[®], Alteraciones cromosómicas, rupturas cromatídicas, variaciones morfológicas de las regiones nucleolares AgNOR, AgNORs/Célula. *Mesocricetus auratus*.

ABSTRACT

The purpose of this work was determining the gene-toxic damage of three concentrations of the acetaminophen paracetamol[®] in *Mesocricetus auratus* bone marrow cells, and in order to achieve this, five groups were established. These groups were treated with physiological saline solution (negative control), 50 mg/kg/pc. of cyclophosphamide (positive control) and 125, 500, 1000 mg/kg/pc. paracetamol[®] daily for 10 days. After the last administration, the bone marrow was isolated and processed with a micronucleus test, obtaining chromosomes and organizing the nucleolus regions (AgNOR).

A significant increase of micronuclei (MN) was observed in different concentrations of paracetamol[®] ($25.33 \pm 4.04^*$, $31.0 \pm 1.0^*$ y $36.33 \pm 0.58^*$) and cyclophosphamide ($45.66 \pm 7.37^*$) respectively, regarding the negative control ($7.16 \pm 0.28^*$). It was also noted that there was a variation in the number and size of the micronucleus in polychromatic erythrocytes.

Regarding chromosomal alterations, a significant increase was observed in different concentrations of acetaminophen paracetamol[®] ($25.33 \pm 4.04^*$, $31.0 \pm 1.0^*$ and $36.33 \pm 0.58^*$) and cyclophosphamide ($45.66 \pm 7.37^*$) relative to the negative control (1.66 ± 0.58). Also it was observed some three radials exchanges and complex rearrangements, broken chromatids with non centric fragment in different concentrations of acetaminophen and positive control but not in the negative control.

In the evaluation of morphology of the Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) in bone marrow cell of *M. auratus* some differences were found *statistically significant among* areas of AgNOR/cell $3.37 \pm 0.56^*$; $2.38 \pm 0.82^*$; $3.95 \pm 1.02^*$ and $3.03 \pm 0.63^*$ μm^2 for acetaminophen and cyclophosphamide respectively, in relation to the cells of specimens of the negative control group ($1.74 \pm 0.35^*$); general form that treated cells with paracetamol[®] induced AgNOR pleomórficos.

In conclusion, acetaminophen paracetamol[®] increases the frequency of micronucleus test in polychromatic erythrocytes, broken chromatids in the chromosomes and a high significance in morphometric variations nucleolar organizer regions (AgNOR) in bone marrow cells *M. auratus*.

Key words: Micronucleus, acetaminophen, paracetamol[®] Structural chromosomal alterations, Chromatid breaks, morphometric variations Nucleolar Organizer Regions AgNOR, AgNOR/Cell - *Mesocricetus auratus*.

ÍNDICE

	Pág.
DEL JURADO	i
PRESENTACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	01
MATERIAL Y MÉTODOS	08
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	25
PROPUESTA	30
CONCLUSIÓN	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INTRODUCCIÓN

1. Marco filosófico

La genotoxicidad es la línea de la genética que se encarga de buscar la explicación a las alteraciones de las leyes que gobiernan la estructura y fisiología del DNA por causa de agentes físicos, biológicos, químicos y en especial por los fármacos que tienen relevancia debido a la irreversibilidad de sus efectos, su carácter acumulativo y las consecuencias que trae para la salud humana.¹

Los ensayos de genotoxicidad de un fármaco, constituyen una herramienta esencial en la valoración del riesgo, que presenta una particularidad diferencial respecto al resto de efectos tóxicos que pueda causar.²

En el caso, de los efectos genotóxicos, las autoridades reguladoras asumen que para sustancias genotóxicas *in vivo* no existe, *a priori*, un umbral de efecto. Este principio se fundamenta sobre el “*dogma*” de que, en términos de probabilidad, existe el riesgo de que la interacción de una única molécula genotóxica con el DNA del organismo pueda dar lugar a la formación de una lesión premutágena o precancerosa, y que su efecto, sobre el material genético es irreversible y acumulativo, que aunque, sea sumamente baja, no se puede definir un nivel de exposición asociado a riesgo cero.

Esta particular interpretación, tienen su origen en una decisión científica con el objetivo de planear una aproximación cautelosa de protección sanitaria para la población en riesgo y que, a nivel del sistema de salud se implementen políticas de control de los fármacos tóxicos; puesto que, el principio de

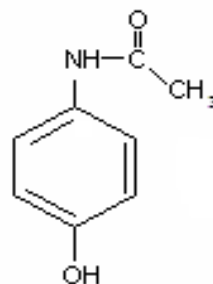
justicia nos obliga a garantizar la distribución justa y equitativa de los beneficios de los servicios de salud a toda la población, independientemente de su ocupación laboral, clase social y lugar dónde resida.³

En tal sentido, la investigación se abocó a probar la hipótesis de que el Acetaminofeno paracetamol[®] posee efecto genotóxico, y como tal exponiendo a la población, que lo utiliza, como analgésico-antipirético de elección en el primer nivel de atención, pues alivia el dolor moderado, como ocurre en la cefalalgia, dismenorrea, trastornos musculares, articulares, de nervios periféricos y fiebre.⁴

2. Marco teórico y antecedentes

El nombre químico del Acetaminofeno paracetamol[®] corresponde a 4-hidroxiacetanilidina, con una estructura química compuesta por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno (figura); su fórmula empírica es $C_8H_9NO_2$; se presenta como un polvo blanco, inodoro de sabor ligeramente amargo, cuyo punto de fusión oscila entre 168-172°C.^{5,6,7,8}

Fig. Estructura química del paracetamol[®]



El paracetamol[®] se absorbe muy bien en el intestino delgado y en el recto, aunque algo más lento en el tubo digestivo alto y es metabolizado en un 95% por el hígado. Los principales metabolitos son conjugados con sulfato o

ácido glucorónico. Una pequeña fracción se convierte en fracción microsomal, utilizando el sistema de oxidasas mixtas y citocromo P-450, que normalmente es atrapado e inactivado por el glutatión y eliminado como conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico. A dosis elevadas y continuas de paracetamol[®], la velocidad de formación de este metabolito excede al de la síntesis de glutatión hepático, y se fija por enlaces covalentes a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas a las que inactiva, provocando necrosis hepática^{8,9}.

Existen numerosos estudios sobre el daño hepático del paracetamol[®], los que han sido realizados tanto en humanos como en animales de experimentación.^{10,11,12,13,14,15,16} Se ha reportado que el paracetamol[®] provoca episodios de asma y rinitis cuando es ingerido en exceso¹⁷ y el uso crónico del acetaminofeno paracetamol[®] en ratas preñadas administrado durante todo el período de preñez a dosis superiores a 70mg/Kg por día, demostró que causa un 15,7% de malformaciones en las crías, por lo que, se recomienda que debe evitarse su uso de manera continua en mujeres embarazadas.¹⁸

En México se ha realizado un estudio en el que se valoró el daño del paracetamol[®] en el ADN de amniocitos mediante el ensayo cometa,¹⁹ así mismo, en Sarajevo se evaluó la genotoxicidad del paracetamol[®] en células de *Allium cepa*, encontrándose mutaciones a concentraciones de 5, 25 y 40 microg/ml.²⁰

Para poder determinar el efecto genotóxico de cualquier sustancia y en especial de los compuestos farmacológicos es necesario el uso de

biomarcadores. El término **biomarcador** se refiere a cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, ya sea químico, físico o biológico.²¹ Los biomarcadores según, Albertini y col. 1996 citado en Pastor Benito, 2002²¹ se dividen en:

a) Biomarcadores de exposición, los que detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismos a diferentes niveles; las técnicas utilizadas para detectar la exposición a diferentes productos, miden directamente el compuesto en cuestión o los metabolitos que generan.

b) Biomarcadores de efecto, mide el daño genético una vez que éste ha sido procesado por el organismo y reflejan daños a exposiciones pasadas, que son útiles para detectar daño acumulado. Este tipo de biomarcador es el más utilizado en estudios de biomonitorización en humanos. Pueden ser **informativos** y **relevantes**; como **informativos** están: las aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas y en los **relevantes** se incluyen las alteraciones específicas en protooncogenes y genes tumor supresor.

c) Biomarcadores de susceptibilidad, se basa en identificar aquellas diferencias interindividuales que hacen que un individuo sea más susceptible o responda de manera diferente, con un mayor riesgo para su salud, frente a diferentes exposiciones ambientales.

Actualmente existe disponibilidad de numerosos marcadores biológicos para evaluar los efectos genotóxicos transitorios y permanentes y se basan principalmente, en métodos citogenéticos como, test de micronúcleos y aberraciones cromosómicas.^{22, 23} El test de micronúcleos, es un indicador de

mutagenicidad fácil de efectuar por lo que viene siendo ampliamente utilizado en la detección de los efectos genotóxicos de números compuestos;^{24,25,26,27,28,29} su aplicación ha permitido encontrar un aumento en la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal,^{30,31} así como, en eritoblastos policromáticos de células expuestas a agentes mutágenos diversos.^{32, 33} Otro marcador es el test de las alteraciones cromosómicas, usadas para evaluar daños numéricos y estructurales causados por agentes mutágenos, muchas de las cuales están asociadas a abortos espontáneos; se reporta que estos productos presentan complementos cromosómicos triploídes o tetraploídes, o trisómicos y monosómicos para cromosomas autosómicos, involucrando aquellos que tienen que ver con la viabilidad; los daños estructurales están relacionadas a diferentes tipos de cáncer.¹

La utilización de la técnica de las regiones organizadores nucleolares (NOR), permite determinar la correlación positiva de las proteínas AgNOR con los procesos transcripcionales de los genes ribosomales, lo que conduce a considerar a las proteínas AgNOR como marcadores de genes ribosomales activos, y en gran medida, como marcadores del grado de actividad funcional y diferenciación celular, parámetro valioso de la cinética celular y significativamente asociado con la rapidez de la duplicación celular, y particularmente importante como apoyo en el diagnóstico y pronóstico de diferentes casos de neoplasias.^{34,35} Esta técnica, tiene además una serie de ventajas como sencillez, rapidez, bajo costo y valoración objetiva reproducible mediante el análisis morfométrico.³⁶

Es importante destacar que el potencial genotóxico de una sustancia esta íntimamente relacionada a la variabilidad individual, es decir del genoma de cada individuo. Las características genéticas en el metabolismo de los xenobióticos, así como la capacidad para realizar la reparación del DNA en el momento oportuno, y la capacidad de las células para entrar en apoptosis cuando el daño ha sido excesivo o irreversible, son distintas en cada persona.¹ En nuestra Ciudad los trabajos que se han realizado sobre Acetaminofeno paracetamol[®] están referidos a la hepatotoxicidad del fármaco cuando este es administrado vía oral.³⁷ Al no existir estudios que describan el efecto genotóxico del Acetaminofeno paracetamol[®] y, conocedores del amplio uso de este analgésico-antipirético por la población sin prescripción médica, el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto genotóxico de tres concentraciones del Acetaminofeno paracetamol[®] en células de médula ósea de *Mesocricetus auratus*.

Objetivo general:

- Determinar el daño genotóxico en células de médula ósea de *M. auratus* por efecto de tres concentraciones de Acetaminofeno paracetamol[®]

Objetivos específicos:

- Identificar y cuantificar los micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) en médula ósea de *M. auratus* expuestas al Acetaminofeno paracetamol[®].

- Identificar y cuantificar las alteraciones cromosómicas en las células de médula ósea de *M. auratus* expuestas al Acetaminofeno paracetamol[®].
- Evaluar morfométricamente las regiones AgNORs en eritrocitos policromáticos (EPC) en médula ósea de *M. auratus* expuestas al Acetaminofeno paracetamol[®].
- Determinar la significancia del índice de genotoxicidad (IG) basada en la frecuencia de micronúcleos, frecuencias de alteraciones cromosómicas y de las variaciones de las regiones AgNOR en células de médula ósea de *M. auratus* expuestas al Acetaminofeno paracetamol[®].

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material del estudio

1.1. Material de prueba: Acetaminofeno paracetamol[®] compuesto farmacológico utilizado en concentraciones de 125, 500 y 1000 mg/kg. peso corporal (p.c).

1.2. Material biológico: constituido por ejemplares hembras de *Mesocricetus auratus* de dos meses de edad; en condiciones de humedad y temperatura convencionales y alimentados a base de purina, avena y agua sin restricción; de acuerdo a las normas éticas para el uso y manejo de animales de experimentación.³⁸

2. Métodos y técnicas

Se utilizó el diseño de estímulo creciente con controles: positivo y negativo.

1.2. Tratamiento de *Mesocricetus auratus* con Acetaminofeno paracetamol[®]:

Se estableció cinco grupos de 03 animales cada uno, seleccionados al azar.

A tres grupos se les administró Acetaminofeno en dosis, mg/kg/p.c. de 125 primera, 500 segunda y 1000 tercera, vía oral durante 10 días.

A otro grupo se lo trató con 50 mg/kg/p.c de ciclofosfamida (control positivo) y el último grupo fue tratado con 1ml de suero salino fisiológico (SSF) (Control negativo).

Al día siguiente de la última administración de cada uno de los tratamientos, se procedió a realizar los procedimientos usados para los diferentes biomarcadores propuestos en el estudio.

2.2. Procedimientos utilizados para los diferentes biomarcadores:

2.2.1. Test de micronúcleos:

Para la obtención de micronúcleos (MN) se usó la técnica de Schmid (1976)³⁹ modificada, para ello, se sacrificó a los especímenes de cada tratamiento, realizándose la disección de ambos fémures y luego se extrajo la médula ósea en 10 ml de SSF, en seguida se centrifugó a 1000 r.p.m durante 10 minutos eliminándose el sobrenadante. El pellet fue fijado en alcohol: ácido acético 3:1 (carnoy) por 10 minutos, después, se resuspendió y nuevamente centrifugó; con el pellet homogenizado, se realizó el goteo sobre láminas portaobjeto limpias, dejándose secar para luego proceder a teñir las láminas con Giemsa al 5%. Se codificaron las láminas y posteriormente fueron analizadas al microscopio óptico a 1000X.

2.2.2. Test de las alteraciones cromosómicas:

Para obtener placas cromosómicas se utilizó la técnica de Alder (1984)⁴⁰ modificada. A los especímenes de **M. auratus** de cada tratamiento se les inyectó vía intraperitoneal 1ml de colchicina, luego de 60 minutos se procedió a sacrificar al espécimen y se disectaron los fémures, inmediatamente después se cortaron las epífisis del hueso y con ayuda de micropipetas se extrajo la médula ósea.

La muestra de médula ósea fue colocada en solución hipotónica de KCl 0,075 M. por 10 minutos a 37°C, pasado ese tiempo se

resuspendió y centrifugó a 800 r.p.m. durante 8 minutos; luego se eliminó el sobrenadante y agregó el fijador (alcohol: ácido acético 3:1) dejándose actuar por 10 minutos. Trascorrido dicho tiempo, nuevamente se centrifugó a 800 r.p.m por 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y agregó 0,5 ml de fijador, se resuspendió constituyendo está la suspensión final. Posteriormente se realizaron los preparados cromosómicos a partir de la suspensión, dejando caer una o dos gotas sobre una lámina porta objeto limpia, se dejó secar a temperatura ambiente y luego se coloreó con Giemsa al 5% para ser observadas al microscopio óptico a 1000X.

2.2.3. Tinción de regiones organizadoras del nucleolo (AgNOR):

Los especímenes de cada tratamiento se sacrificaron y disectaron los fémures, de los cuales se extrajo la médula ósea en SSF. Cada suspensión celular obtenida se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y se fijó en alcohol: ácido acético 3:1 (carnoy) por 10 minutos, se centrifugó y con el pellet de este, previo homogenizado, se realizó el goteo sobre láminas portaobjeto, dejándose secar al ambiente. Las láminas fueron coloreadas en oscuridad a 37° durante 24 minutos, con una solución de gelatina al 0.66%, ácido fórmico 1% y nitrato de plata (AgNO₃) al 33.3%, (técnica de Treré 2000 modificada).⁴¹ Luego de la coloración, las láminas se enjuagaron en agua destilada, dejándose secar al medio ambiente, para luego ser observadas al microscopio óptico a 1000X.

3. Evaluación de los preparados citológicos:

3.1. Evaluación de los Micronúcleos:

Para identificar a los Micronúcleos (MN) presentes en las células de médula ósea por efecto del Acetaminofeno se consideraron los criterios de identificación de Fenech (2000)⁴² que establece lo siguiente:

- a) Los micronúcleos deben ser 1/3 del volumen del núcleo principal
- b) Deben estar claramente separados del núcleo principal
- c) Se colorean con la misma intensidad que el núcleo principal.

En los preparados citológicos de cada uno de los tratamientos se cuantificó el número de eritrocitos policromático (PCE) portadores de micronúcleos (PCE-MN) en un total 2000 (PCE) por animal. Se determinó el índice de genotoxicidad como la relación de PCE-MN/PCE total x 100.⁴³

3.2. Evaluación de las alteraciones cromosómicas:

En la identificación de las alteraciones cromosómicas se analizaron 300 placas cromosómicas en metafase de cada tratamiento, considerando la morfología y número de los cromosomas en las células analizadas; las alteraciones fueron registradas y expresadas en frecuencias.

3.3. Evaluación de Regiones AgNOR:

Se evaluó las regiones AgNORs en 100 eritrocitos policromáticos de *M. auratus* mediante la técnica de análisis morfométrico por imagen, utilizando el software Visilog Waver, que permite determinar el área de AgNORs/célula.

4. Análisis de los resultados:

Se utilizó el análisis de varianza (ANAVA) y el test de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $p < 0.05$, para establecer las diferencias estadísticas entre las concentraciones empleadas, tanto para el índice de genotoxicidad de los PCE-MN, así como, para las alteraciones cromosómicas en las células de médula ósea.

El análisis estadístico para Regiones Organizadoras de nucleolo (AgNORs), se realizó mediante el ANAVA y se compararon las medias por el test de Fischer (F) empleando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Al exponer a acetaminofeno paracetamol[®], a las células de la médula ósea de *Mesocricetus auratus*, se registró una alta frecuencia de micronúcleos (MN) en los eritrocitos policromáticos (EPC), estableciéndose un índice de genotoxicidad significativamente diferente al del grupo control negativo (Tabla 1).

La figura 1, refleja un incremento significativo de micronúcleos (MN) en las diferentes concentraciones de acetaminofeno ($17.95 \pm 2.71^*$, $22.32 \pm 1.01^*$, $26.33 \pm 1.08^*$) y ciclofosfamida ($27.22 \pm 3.703^*$), respecto al grupo control negativo ($0.71 \pm 0.028^*$). Así mismo, se observó, variación en el número y tamaño de los micronúcleos presentes en los eritrocitos policromáticos (Fig. 2)

En relación a las alteraciones cromosómicas propiamente dichas, se observó también, un incremento significativo de alteraciones cromosómicas en las diferentes concentraciones de acetaminofeno ($25.33 \pm 4.04^*$, $31.0 \pm 1.0^*$ y $36.33 \pm 0.58^*$) y ciclofosfamida ($45.66 \pm 7.37^*$) respecto al control negativo (1.66 ± 0.58) (Tabla.2 y Fig.3), así también, se pudo evidenciar alteraciones como intercambio tri-radial y rearrreglos complejos, ruptura cromatídica con fragmento acéntrico desplazado en las diferentes concentraciones de acetaminofeno paracetamol[®] y control positivo más no en el control negativo (Figs.4, 5 y 6).

Al realizar el análisis morfométrico de las regiones nucleolares en células de médula ósea de *M. auratus* se encontró diferencias estadísticamente significativa entre áreas de AgNOR/célula de $3.37 \pm 0.56^*$; $2.38 \pm 0.82^*$; $3.95 \pm 1.02^*$ y $3.03 \pm 0.63^* \mu\text{m}^2$ para acetaminofeno paracetamol[®] y ciclofosfamida, en relación al grupo control negativo ($1.74 \pm 0.35^*$) (Tabla. 3 y Fig. 7)

El análisis microscópico con objetivo de 1000X reveló, que en las células tratadas con acetaminofeno paracetamol[®] presenta predominancia de AgNOR pleomórficos (Fig. 8), no así en el grupo control negativo (Fig. 9).

Tabla 1. Concentraciones, número de células observadas e índice de genotoxicidad en eritrocitos policromáticos en médula ósea de *M. auratus* de controles negativo, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol[®]

Concentraciones mg/kg/p.c/día		Total de PCE Observados	Índice de genotoxicidad $\bar{X} \pm DE$
Suero Salino Fisiológico (Control Negativo) 0		2000	0.71 ± 0.028
Ciclofosfamida (Control Positivo) 50		2000	27.22. ± 3.703*
Acetaminofeno	125	2000	17.95 ± 2.71*
	500	2000	22.32 ± 1.01*
	1000	2000	26.33 ± 1.08*

*Diferencias $p < 0.05$ \bar{X} = Media

DE = desviación estándar

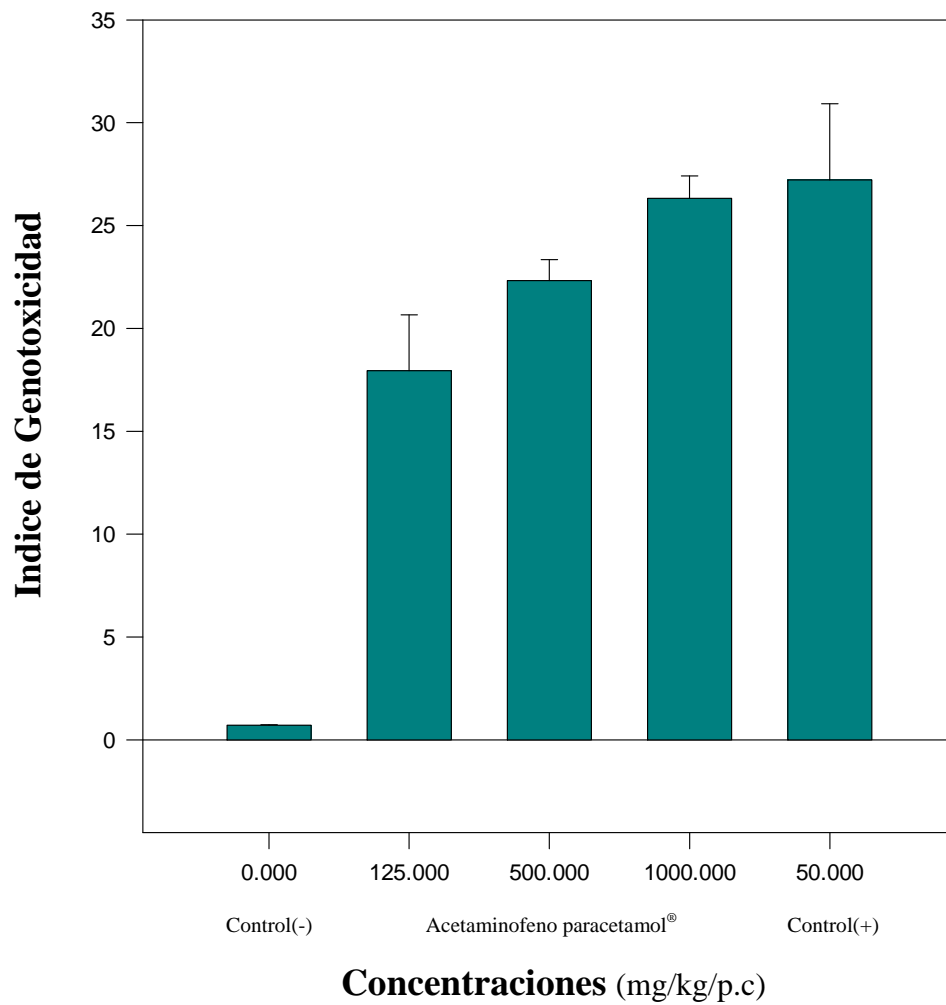
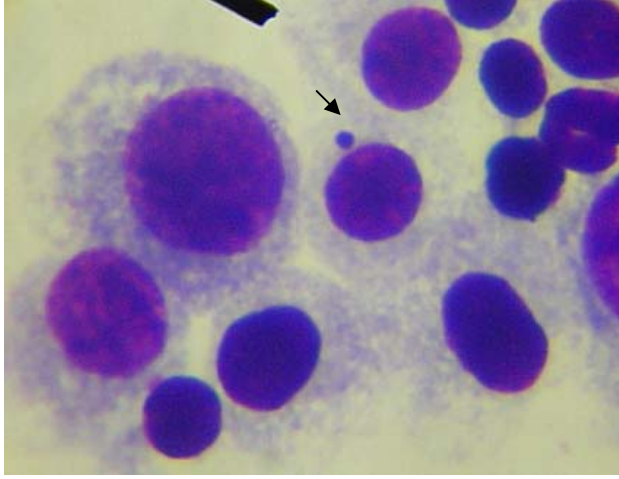
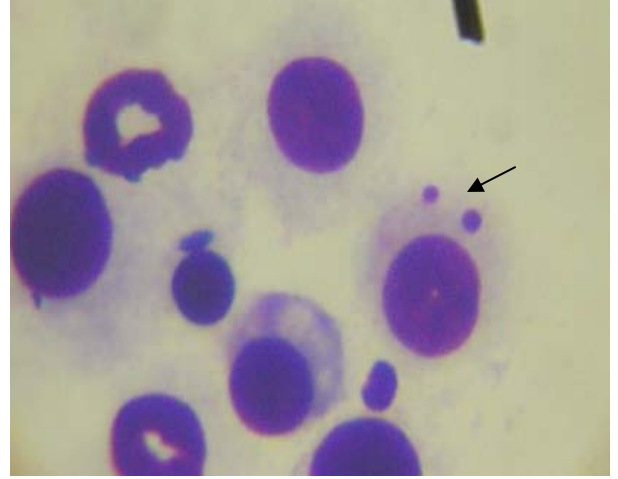


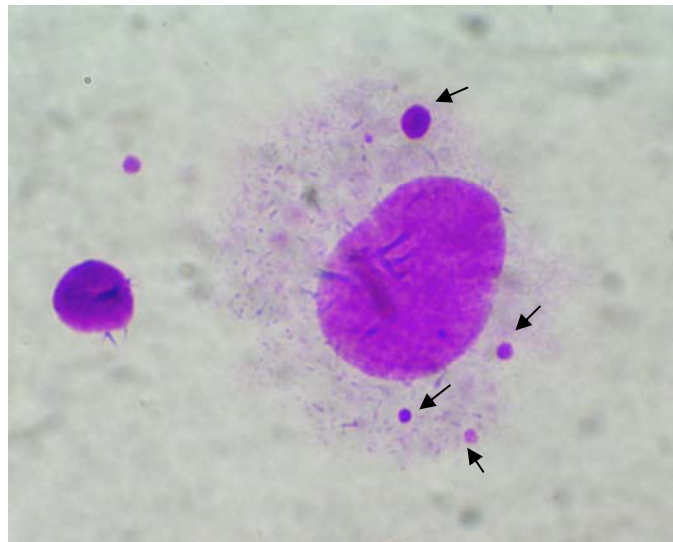
Fig. 1. Concentraciones e índice de genotoxicidad en eritrocitos policromáticos en médula ósea de *M. auratus* en grupos controles negativo, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol[®] ($p < 0.05$)



a)



b)



c)

Fig.2. Eritrocitos policromáticos de médula ósea de *M. auratus* mostrando a) un micronúcleo b) dos micronúcleos c) cuatro micronúcleos en diferente tamaño, por efecto del Acetaminofeno paracetamol[®].1000X

Tabla 2. Concentraciones, número de placas cromosómicas y frecuencia de alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de *M. auratus* de controles negativo, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol®

Concentraciones mg/kg/p.c/día		Número de Placas cromosómicas Analizadas	Frecuencia de Alteraciones cromosómicas $\bar{X} \pm DE$
Suero Salino Fisiológico (Control Negativo) 0		300	1.66. \pm 0.58
Ciclofosfamida (Control Positivo) 50		300	45.66 \pm 7.37*
Acetaminofeno	125	300	25.33 \pm 4.04*
	500	300	31.0 \pm 1.0*
	1000	300	36.33 \pm 0.58*

*Diferencias $p < 0.05$ \bar{X} = Media

ES = desviación estándar

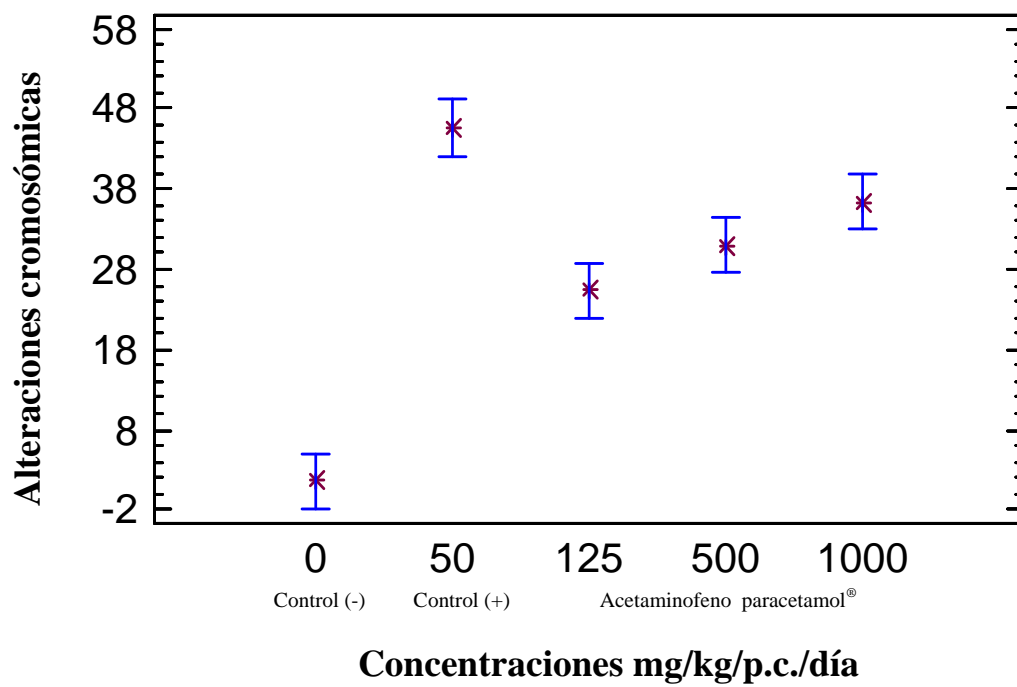
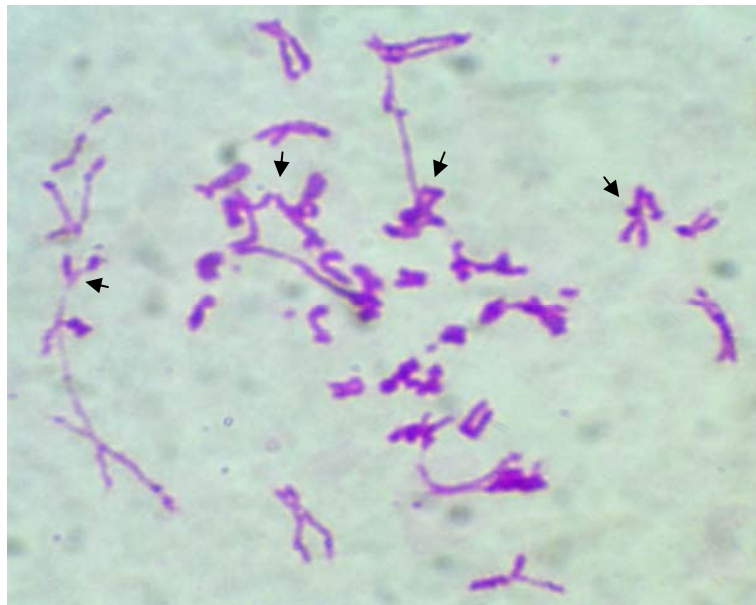


Fig. 3. Concentraciones y frecuencia de alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de *M. auratus* en grupos controles negativos, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol[®] (p<0.05)



a)



b)

Figura 4: Placas cromosómicas de *M. auratus*, mostrando intercambio tri-radial (a) y rearrreglos complejos (b), por efecto del Acetaminofeno paracetamol[®]
1000X

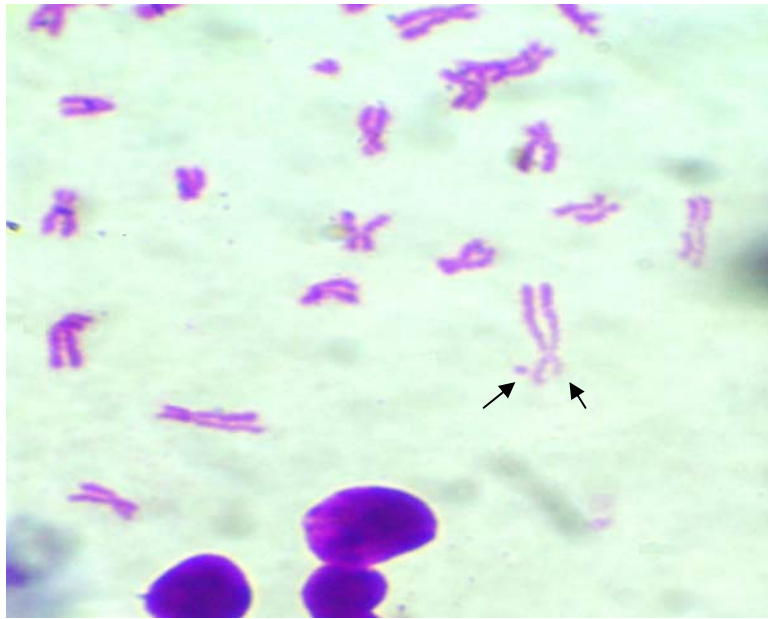


Figura 5: Placa cromosómica parcial de *M. auratus* que muestra ruptura cromatídica con fragmento acéntrico desplazado, por efecto del Acetaminofeno paracetamol[®] 1000X



Figura 6: Placa cromosómica normal de *M. auratus* ($2n=44$), control negativo.1000X

Tabla. 3. Concentraciones, número de células y área AgNOR/célula (μm^2) en eritrocitos policromáticos en médula ósea de *M. auratus* de controles negativo, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol[®] (mg/kg/pc).

Concentraciones mg/kg/pc/día		Número de células analizadas.	Área AgNOR/célula $\bar{X} \pm \text{ES}$
Suero Salino Fisiológico (Control Negativo) 0		100	1.74 \pm 0.35*
Ciclofosfamida (Control Positivo) 50		100	3.03 \pm 0.63*
Acetaminofeno	125	100	3.37 \pm 0.56*
	500	100	2.38 \pm 0.82*
	1000	100	3.95 \pm 1.02*

*Diferencias $p < 0.05$

\bar{X} = Media

ES = desviación estándar

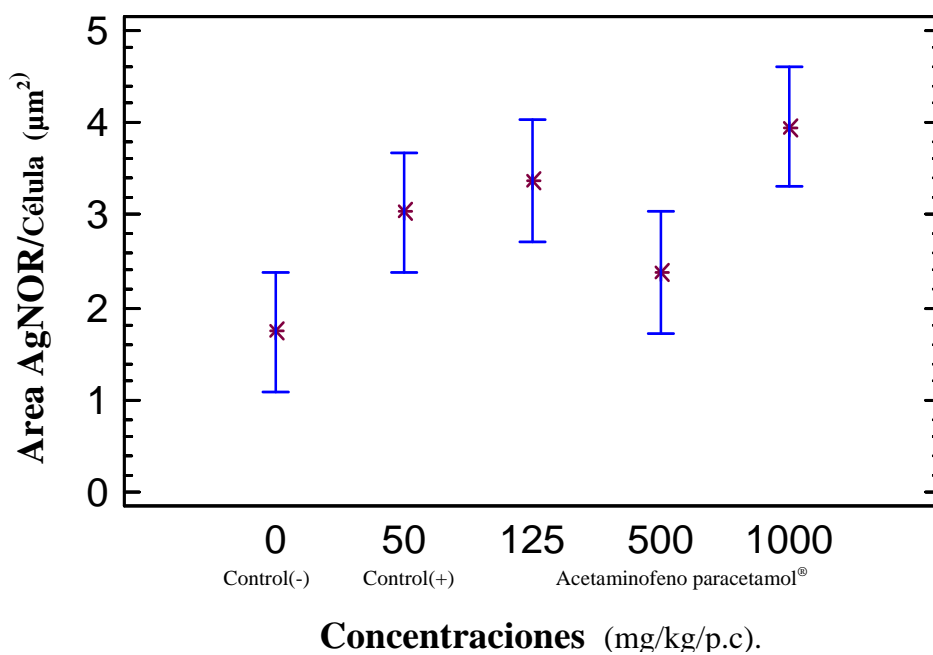
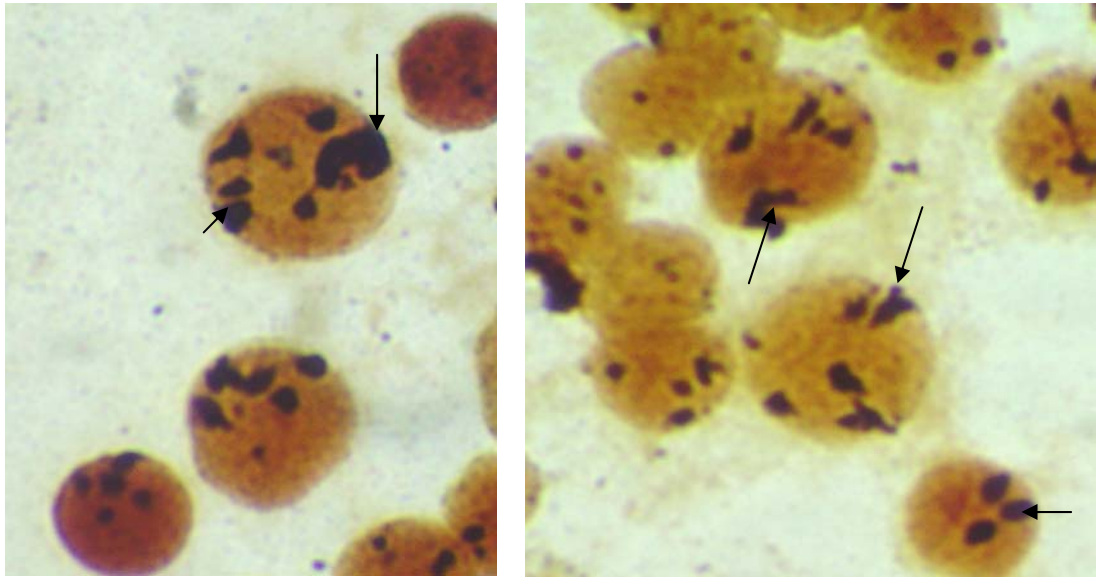


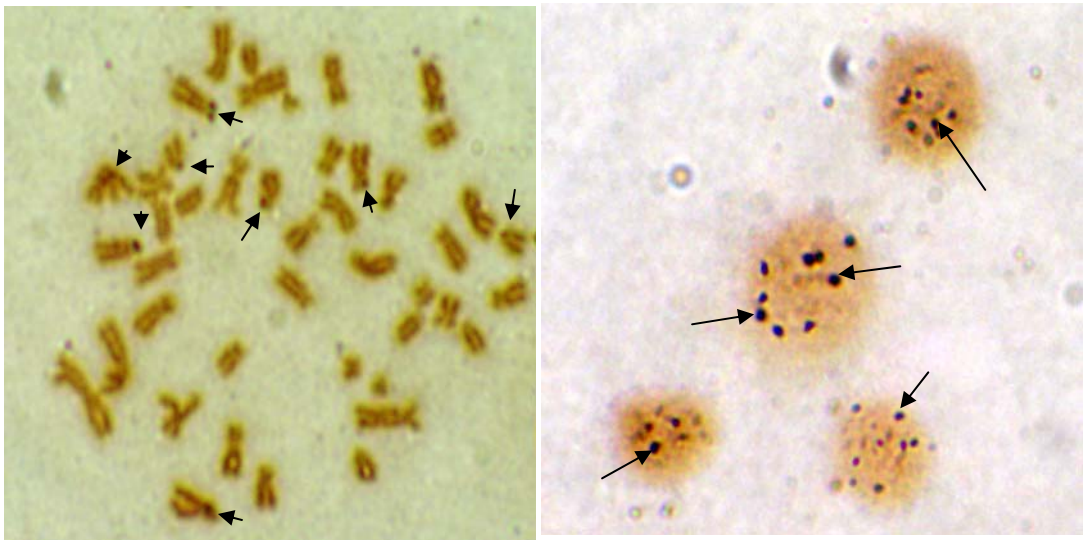
Fig. 7. Concentraciones y área AgNOR/célula (μm^2) en eritrocitos policromáticos en médula ósea de *M. auratus* de controles negativo, positivo y tratados con Acetaminofeno paracetamol[®] (mg/kg/p.c).



a)

b)

Fig. 8. a y b) Eritrocitos policromáticos de médula ósea de *M. auratus*, mostrando regiones AgNOR pleomórficas por efecto del Acetaminofeno paracetamol[®] (mg/kg/p.c).1000X



a)

b)

Fig. 9. a) Regiones AgNOR en cromosomas y b) Eritrocitos policromáticos de médula ósea de *M. auratus* del control negativo, mostrando regiones AgNOR 1000X

DISCUSIÓN

El ensayo de genotoxicidad in vivo en *Mesocricetus auratus* se realizó con la finalidad de detectar el efecto del Acetaminofeno paracetamol[®] en las células de médula ósea. En la experiencia, los indicadores de los efectos mutagénicos del paracetamol[®] en eritrocitos policromáticos (PCE) de la médula ósea de *M. auratus* se demuestran por la presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (PCE-MN) (Tabla 1 y Figs. 1 y 2).

La formación de micronúcleos ocurre en anafase, cuando un fragmento cromosómico que no posee centrómero, disminuye sus probabilidades de integrarse a cualquiera de los núcleos hijos por carecer del elemento indispensable para orientarse y asociarse al huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como fragmentos cromosómicos, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas dando lugar a uno o varios núcleos secundarios o micronúcleos²². La alta frecuencia de los micronúcleos o índice de genotoxicidad en proporción mayor que el control, evidencian el efecto mutagénico del paracetamol[®]. Tal potencial mutágeno ha sido reportado en células de *A. cepa*²⁰, en amniocitos¹⁹ y cultivo de linfocitos humanos⁴⁴. Sin embargo, Reyes y col.,⁴⁵ afirman que los efectos genotóxicos potenciales del paracetamol son fenómenos que acontecen solo a dosis elevadas no indicadas, hechos que no concuerdan con nuestros reportes, en el que se presentaron micronúcleos en las concentraciones de 125, 500 y 1000 mg/kg/pc del paracetamol[®] utilizadas.

Las variaciones del tamaño de micronúcleos encontrados en los PCE demuestran el comportamiento clastogénico y aneugénico del paracetamol[®], pues los estudios en genotoxicidad han establecido que los compuestos clastógenos

producen micronúcleos pequeños los que se forman como producto de roturas en la hélice de DNA o fragmentos cromosómicos y los aneugénicos generan micronúcleos grandes formados por cromosomas completos que no migraron debido a la alteración en la arquitectura de los microtubulos,^{23, 46, 47} eventos que se han hecho evidentes en el presente estudio (Figs.2).

En relación a las alteraciones cromosómicas propiamente dichas, las quiebras o rupturas cromatídicas teloméricas, forman un tipo de alteración frecuente encontrado en las concentraciones de Acetaminofeno paracetamol[®], a los que los especímenes fueron expuestos (Fig. 4 y 5). Algunas aberraciones como alteraciones de tamaño o forma resulta de la quiebra simultánea de dos o más cromosomas en una misma célula y la consecuente reasociación, originando neocromosomas, lo cual conduciría a una desregulación de transcripción de genes estructurales afectando parcial o totalmente su función. Tales quiebras pueden afectar a una sola cromátida u ambas cromátidas.^{44,48}

La presencia de las quiebras cromatídicas o/y cromosómicas son el resultado de lesiones del DNA, que, cuando no son reparadas, son evidenciadas en las metafases de la división celular; esto sería indicativo de la pérdida o modificación de las funciones de las enzimas de replicación y de reparación del DNA, que por trabajar en forma deficiente, ocasionan que se mantengan las lesiones en las cadenas del DNA recién sintetizadas.⁴⁹ Así también, estaría afectando a las proteínas implicadas en los mecanismos de control celular, de tal manera que, permiten el avance de cromosomas portadores de material dañado hasta finalizar la mitosis. La presencia de figuras trirradiales, rearreglos cromosómicos complejos y fragmentos acéntricos evidenciados en la experiencia

sería un indicativo que Acetaminofeno paracetamol[®] podría, estar inhibiendo a la topoisomerasa II como el caso de los bioflabonoides, etopósido y tenipósido compuestos que son reportados como genotóxicos.⁵⁰ Todo esto nos permite relacionar la presencia de alteraciones con el mecanismo de acción de la droga-enzima que produce rupturas en el ADN con imposibilidad de la célula para reparar correctamente estos daños, lo cual pueden tornarse irreversible por la saturación de 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 cáncer.⁵¹

Al evaluar las Regiones AgNOR en células de médula ósea de *M. auratus* por efecto del paracetamol[®], se pudo determinar diferencias significativas en las variaciones morfométricas de los AgNOR s en células tratadas y del control positivo respecto al control negativo. Estas diferencias revelan que los genes involucrados en las regiones nucleolares también resultan afectados, probablemente por la formación de quinoneimina reactiva, que es un radical libre de oxígeno que resulta del metabolismo del paracetamol por la citocromo p450,⁵² ocasionando severos daños al sistema celular, por su capacidad de interactuar con los grupos SH de la cisteína o metionina en las proteínas⁵³ y especialmente con el DNA a nivel de los carbonos C₅ y carbono C₆ de las bases o con los grupos amino de las bases puricas,⁵⁴ generando alteraciones que conllevan a cambios en las regiones AgNOR.

Las variaciones de las regiones AgNOR en la forma, el número, localización, disposición, intensidad de tinción y morfología, han demostrado en diferentes estudios, tener relación con la actividad transcripcional de la célula, con

el grado de ploidia, y con la actividad proliferativa tumoral.^{55,56} Por ello, la mayor área nucleolar en células tratadas indicaría, alteración de los genes ribosomales que se evidencian por la alta actividad proteica, evento que también caracteriza a las células tumorales.⁵⁷ La forma pleomórfica de AgNOR presentes en las células tratadas con paracetamol[®] también son indicativo de alteración en los genes ribosomales, que pierden homología estructural entre los pares cromosómicos del cual forma parte, que en estado normal se mantienen asociados estructural y funcionalmente durante la interfase;^{58,59} ésta variación en el patrón morfológico de las regiones AgNOR es descrita también como marcador de proliferación celular alterada.⁶⁰

La presencia y el aumento en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos, las alteraciones cromosómicas y las variaciones en las regiones AgNOR en las células de la médula ósea de *M. auratus*, tratadas con Acetaminofeno paracetamol[®] evidencian que este fármaco es potencialmente genotóxico; por tanto, los estudios contribuyen a alertar a la población del peligro de su uso, muchas veces sin prescripción médica, lo cual deriva, a que se sugiera, mayor control sobre el uso del paracetamol en razón a los resultados obtenidos y a los alcances de mortalidad e insuficiencia hepática reportada por la FDA.^{61,62}

Aún cuando, es conocido que el avance de la ciencia vislumbra muchos mecanismos de control de la célula, los diferentes daños que se ocasionen en el DNA con el tiempo pueden expresarse en un cáncer, debido a que el complejo génico que intervienen en la regulación y reparación del DNA se pueden presentar en diferentes formas alélicas en cada individuo.

Si bien es cierto que el material de prueba es el DNA de *M. auratus*, también es conocido lo común de los genomas de las diferentes especies, es por ello que, *M. auratus* es científicamente aceptado como un biosistema de prueba. Así mismo, los ensayos in vivo de genotoxicidad implican como norma general, la utilización de roedores de laboratorio en la valoración del potencial genotóxico de sustancias químicas.⁶³

El aporte reside en que acetaminofeno paracetamol[®] tiene actividad genotóxica, por lo que, nos permitimos sugerir que la administración de dicho fármaco sea regulada.

PROPUESTA

Muchos agentes químicos y fármacos son mutágenos capaces de interaccionar con el DNA, directa o indirectamente, provocando cambios en las bases alterando la información del material genético, lo que lleva a aumentar la incidencia de enfermedades genéticas. La acción toxica de un compuesto no solo depende de la dosis y de las enzimas de metabolización, sino también de la capacidad del compuesto o de sus metabolitos de unirse a los lugares específicos y poder así ejercer su acción.

Los resultados obtenidos en la experiencia nos indican los efectos genotóxicos del fármaco acetaminofeno paracetamol[®], que, como se conoce, es usado por la población muchas veces sin prescripción médica, por tanto, la población y las autoridades deben tener en cuenta el daño que se estaría generando sobre el DNA del hombre, que a la larga ocasionaría enfermedades y malformaciones como sobrecarga a la sociedad. Por ello, se propone aumentar los estudios de biomonitoreo, con el objetivo de contribuir con un mayor conocimiento a los profesionales de salud para normar su uso e implementar políticas de control de los fármacos tóxicos. Por lo que, se plantea:

1. Realizar protocolos para evaluar fármacos, aditivos, medicamentos y compuestos químicos en general.
2. Monitorear a individuos expuestos en forma laboral, accidental o terapéutica.
3. Usar metodologías diagnósticas para la caracterizar el daño en síndromes de inestabilidad cromosómicas.
4. Usar tecnologías moleculares para detectar el daño específico.

CONCLUSIONES

Del presente estudio se concluye que el paracetamol[®]:

- ✓ Aumenta la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de médula ósea de *Mesocricetus auratus*, variando significativamente el índice de genotoxicidad en las concentraciones trabajadas, indicativo de la actividad clastogénica y aneugénica.
- ✓ Aumenta significativamente la frecuencia de alteraciones cromosómicas en las células de médula ósea de *M. auratus*, en las concentraciones trabajadas.
- ✓ Produce una alta significancia en las variaciones morfométricas de las Regiones AgNOR en células de médula ósea de *M. auratus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Genética en Medicina. Cuarta edición. Barcelona. España. Editorial Masson S.A. 2002.
2. Guzmán A. Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia. Tesis para optar el grado de Doctor en Genética. Universidad Autónoma de Barcelona-España. 2008
3. Salas SR. Principios y enfoque bioético en la educación médica cubana. Rev Cubana Educ Médica Superior. 1996; 10 (10): 28-37
4. Bertram G. Farmacología Básica y Clínica. Novena edición. México. Editorial Manual Moderno. 2005.
5. Goodman LS, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica Novena edición. DF. México. Editorial Mc Graw Hill Interamericana S.A. 1996.
6. Florez J, Armijo JA. Farmacología Humana. Segunda edición. Barcelona España. Edic. Científicas y Técnicas. 1992.
7. Revista Panamericana de salud pública. Pam Am Public Health. 1997; 2(4).
8. Genaro A. Farmacia Remington. 19^{ava} edición. Buenos Aires Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1998.
9. Rosa H, Prudente M, Cardoso V. Paracetamol hepatic necrosis and its prevention by cholestyramine. Arq. Gastroenterol; 1984; 21 (4):164-166.

10. Uret C. Intoxicación por acetaminofeno: paracetamol. Méd.Crit. Venez; 1987; 2(1):2-6.
11. Caruy C. Efectos hepáticos da associação de anestésicos voláteis e paracetamol: estudo experimental em ratos. Tesis Doctoral. Campinas; s.n. Nov.102p. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade Ciências Médicas. 1998.
12. Trujillo M, Uret C. Tratamiento de la intoxicación por paracetamol. Bol. Hosp. Univ. Caracas. 1989; 19(27):39-42.
13. Soto R. Daño hepático por acetaminofeno: caso clínico. Ver. Méd. Cobre. 1991; 1(2):99-102.
14. Salas C, Torealba A, Morales A, Fernández L, Mago A. Efectos de la colestásis sobre la toxicidad hepática del acetaminofeno en ratas. GEN. 1995; 49(1): 42-49.
15. Mahadevan SB, Mckiernan PJ, Davies P, Nelly DA. Paracetamol induced hepatotoxicity. Arch Dis Chile. 2006; 91(7):598-603.
16. Salhanick SD, Orlow D, Holt DE, Pavalides S, Reenstra W, Buras JA,. Endothelially derived nitric oxide affects the severity of early acetaminofphen-induced hepatic injury in nice. Acad. Emerg Med. 2006; 13(5):479-485.
17. Anon T. Paracetamol ingerido en exceso favorece episódios de asma y rinitis. Esencia odontol. 2003; (105):31.
18. Andalaft Neto J, Simões MJ, Evêncio Neto J, Kulay Junior L. Efecto do uso crônico de acetaminofeno na prenhez da rata. Ver. Bras. Ginecol. Obstt. 1999; 21(2):105-108.

19. Baez R, Razo G, García-Cavazos R, Madrigal E. Determinación del daño al ADN inducido por paracetamol en amniocitos humanos por medio del ensayo cometa. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2000; 15-21.
20. Aganovic-Musinovic I, Todic M, Becic F, Kusturica J. Genotoxicity evaluation of paracetamol applying Allium test. *Med Arh*. 2004; 58(4):206-209.
21. Pastor S. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas expuestas a plaguicidas mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis Optar Grado Doctor en Biológicas. Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona. 2002.
22. Zuñiga G, Gómez B. La prueba de micronúcleos. *Revista de divulgación científica y tecnológica de Universidad Veracruzana*. 2006; 19 (1).
23. Pérez-Azola L, La Fuente-Indo N. Parámetros discriminantes de efecto aneuploidogénico y clastogénico utilizando simultáneamente los ensayos de micronúcleos y citogenético. *Lab. de Genética. Toxicol. Fac. de Cs. Qcas. y Farmaceuticas. Universidad de Chile. Libro de Resúmenes del 11 Congreso Latinoamericano de Genética y 31 de Mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental. Puerto Vallarta México. 1994.*
24. Cuenca P, Ramírez V. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Revista de biología tropical Costa Rica*. 2004;50(2).
25. Ramos A, Edreira A, Villescusa A, Vizozo A, Martínez M. Evaluación genotóxica de un extracto acuoso de Aloe vera L. *Rev. Cuba. Plantas med*. 1996; 1(2):18-23

26. Córdova J. Ecogenética a una disciplina de alta resolución para la evaluación de la contaminación ambiental. Boletín informativo de los Micronucleos. UNMSM. 2000.
27. Ramos A, Villescusa A, Vizozo A. Ausencia de genotoxicidad en extractos fluidos de *Ortociphon aristatus blume* (Te de riñón) y *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo). Rev. Cuba. Plantas med. 1996; 1(2):38-43
28. Leal C, Valenciano G, Rojas M, Cortés E. Mutagenic activity of diazepam evaluated by in vivo cytogenetic tests. Arch. Med. Res. 1998; 29(4): 285-9.
29. Lerda D. Estudio de la genotoxicidad de los compuestos del polietilenglicol tereftalato (PET): dimetiltereftalato (DMT) y ácido tereftálico (TPA). Acta toxicol. Argent. 1998; 6(1):11-3
30. Torres O, De Anda A, Ramírez M P, Cantú J M, Zuñiga G. Micronucleos en la mucosa bucal de una persona tratada con cloranfenicol. Divisiones de Biología del desarrollo y Genética. Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente: I M S S. Guadalajara Jalisco México. Libro de resúmenes del 11 Congreso Latinoamericano de Genética y 31 de Mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental. Puerto Vallarta México. 1994.
31. Maluf S, Erdtmann B. Monitoramento citogenético do risco ocupacional hospitalar. Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd do Sul. 1993; 13 (3):145-8
32. Noriega B, Armienta E, Chávez M, Cervantes E, Ojeda L, Quevedo Y. Valoración de genotoxicidad con determinación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos. Bol Med UAS. 2005; 1(8-9): 13-17.

33. Savoldi-Barboza M, Sakamoto-Hojo E, Takahashi C. Influence of novobiocin on gamma-irradiation GO-lymphocytes as analyzed by cytogenetic endpoints. *Genet. Mol. Biol.* 1999; 22(2):217-23
34. Ofner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Totsch M, Spechtenhauser B, Bocker W, Schmid K. Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resects colorectal adenocarcinoma-correlation with tumor stage and long-term survival. *Journal of pathology.* 1995; 175: 441 – 448.
35. Treré D, Migaldi M, Trentin GP. Higher reproducibility of morphometric analysis over the counting method for interphase AgNOR quantification. *Anal cell. Pathol.* 1995; 8:57-65.
36. Derenzini M, Sirri V, Pession A, Trere D, Roussel O, Ochs EL, Hernández-Verdum D. Quantitative Changes of the Two Major AgNOR Proteins, Nucleolin and Protein B23, Related to Stimulation of rRNA Transcription. *Experimental cell Research.* 1995; 219: 276-282.
37. Núñez Iparraguirre NM. Efecto de la Silimarina sobre la hepatotoxicidad inducida mediante la administración oral de paracetamol en *Rattus rattus* var. *Albinus*. Tesis Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Libertad-Trujillo Perú. 1997.
38. The Peru-U.S. Forum for Research Ethics. 2005.
39. Schmid, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A ed. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* New York: Plenum. 1976; 31-53.

40. Adler ID. Cytogenetic tests in mammals. In: Venit Sand Parry JM eds. Mutagenicity Testing: A Practical Approach. Oxford: IRL Press. 1984; 275–306.
41. Treré D. AgNOR Staining and quantification. *Micron* 2000; 31:127-131
42. Fenech M. the in Vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455:81-95
43. Remigio A, Piloto J, García A, Guerra M Sánchez Gobin E y Vega Y. Genotoxicidad de *Indigofera suffruticosa* Mill. (añil cimarrón). *Rev Cubana Plant Med*. 2007;12(3)
44. Ibrulj S., Rahmanovic A., Haveric S., Haveric A. and Durmic Pasic A. Cytogenetic Evaluation of Paracetamol Effects in Human Lymphocytes Culture. *Drug and Chemical Toxicology*. 2007; 30:133–143.
45. Reyes A, De la Gala F, Garutti I. Servicios de Anestesia y Reanimación. Hospital Central Universitario. Gregorio Marañón. Madrid. Patología del aparato Locomotor. 2004;2(3): 176-188
46. Porciello G, Scarpato R, Storino F, Cagetti F, Bellisai F, Morozzi G, Marcolongo R, Migliore L, Ferri C, Galeazzi M. Anomalie cromosomiche, valutate come frequenza di micronuclei spontanei, in soggetti con fenomeno di Raynaud sospetto presclerodermico. Istituto di Reumatologia, Università di Siena. Istituto di Reumatologia, Università di Pisa. *Reumatismo*. 2003; 55(1):28-33
47. Seoane A y Dulout F. Inducción de aneuploidía por metales pesados: su evaluación a través de técnicas citogenéticas en células de mamíferos. *Analecta Veterinaria*. 1999; 19(1/2): 30-39.

48. Higino M R e Silva A. Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores Rev. Saúde Pública. 2002; 36 (3).
49. Galeano LY, Guevra G. Alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por bioflavonoides de la dieta en linfocitos de anemia de fanconi. Rev.Cien.Salud. Bogotá. 2007; 5(2):26-36.
50. Guevara G., Galeano L., Flórez A L. Evaluación genotóxica del etopósido (vp16) n cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina. Ganador del premio Aventis Academia Nacional de Medicina. Revista Colombiana de Cancerología. 2000.
51. Ascarrunz M, Tirado N, Gonzáles A, 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. 2005; 50(2).
52. Martínez-Cayuela M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 1998; 39(1); 5-18.
53. Holtzman J. L. The role of covalent binding to microsomal proteins in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Drug Metabolism Reviews*. 1995; **27**: 277-297
54. Paz MM, Kumar GS, Glover M, Waring MJ, Tomasz M. Mitomycin dimmers polyfunctional cross-linkers of ADN. *J Med Chem*. 2004; 47 (12), 3308-3319
55. Palomo-González, J. Pérez-requena, M. Rego-Gonzáles, M López-Nieto, C. Cañizares Benítez. Evaluación de regiones organizadoras nucleolares

- argirófilas(AgNORs) en neoplasias foliculares tiroideas. REV. ESP PATOL.2002; 35 (1):95-100.
56. Orellana Bustos A Espinoza Santander I, Franco Martínez M. Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. Med. Oral patol. Oral cir bucal Valencia. 2004; .9 (3).
57. Giraldo G, Aranzazu D, De J Rodríguez B, Pérez M y Ramírez M. Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares coloreados con plata(AgNORS) en tumores mamarios caninos. Rev Col Cienc.Pec. 2003; 16(1).
58. Alberts B, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Watson JD. Biología molecular de la célula. Cuarta ed. Barcelona España. Edit. Omega. S.A. 2002.
59. Bonnie J y Steven W. Structure of the rRNA genes in the Hamster sperm nucleus. Journal of andrology. 1995; 16(6).
60. ProazziVaz-Curado A, Guerra J, Dias R. Estúdio quantitativo e morfológico das regiões organizadoras de nucléolo coradas pela prata (AgNORs) em neoplasias benignas e malignas da glândula mamária da espécie canina. Braz.J .vet.Res.amin Sci, São Paulo. 2008; 45(3): 206-210.
61. SALUD ENFERMEDAD-MEDICINA CURATIVA/PALIATIVA-MEDICAMENTOS. Los efectos adversos del paracetamol. http://www.saludlandia.com/default.apPv_Con=12522.
62. Directiva 2000/32/CE d la comisión de 19 de Mayo de 2000 por la se adapta por vigésimo sexta vez al progreso técnico la directiva 67/548/CEE del consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales,

reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (texto pertinente a efectos del EEE).

Diario oficial No. L 136 de 08/06/2000 p. 0001-0089.

63. Müller L, Kikuchi y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweast D. IHC harmonized guidance of genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution reason and import. *Mutant Res.* 1999; 436:195-225.