

## Estudio *in vitro* del Efecto Clastogénico del Fenoterol y la Teofilina en Linfocitos Humanos

Andrés Pareja LÓPEZ, Rodrigo Antonio Urrego ÁLVAREZ, Alejandra Giraldo LÓPEZ, Guillermo Correa LONDOÑO & María Elena Márquez FERNÁNDEZ\*

Grupo de Biotecnología Animal, Línea de Mutagénesis y Cáncer, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de sede, Calle 59A N° 63-020, Medellín, Colombia

**RESUMEN.** La maduración *in vitro* de oocitos es un paso crítico en la producción *in vitro* de embriones, razón por la que se han buscado nuevos protocolos que permitan optimizar este proceso. La teofilina y el fenoterol en oocitos desencadena una serie de procesos fundamentales para la óptima maduración citoplasmática y nuclear de los oocitos, además de ser un medicamento usado en humanos como broncodilatador, estimulante del miocardio y del sistema nervioso central. Ambos medicamentos se han perfilado como reemplazo de las gonadotropinas FSH y LH por su menor costo. El fenoterol es una droga usada para el tratamiento del asma y es un eficiente antioxidante. Sin embargo, algunos autores han reportado efectos genotóxicos y mutagénicos de la teofilina, lo cual puede perturbar cualquier proceso celular por su capacidad de afectar la expresión génica y los productos génicos. Lo anterior podría resultar contraproducente en la optimización de un protocolo de maduración *in vitro* de oocitos. Por otro lado, no se conocen reportes sobre el potencial daño genético que pueda causar el fenoterol. Por esa razón, en este estudio se evaluó el efecto citotóxico por la técnica de exclusión del colorante vital azul de tripano de la teofilina y la integridad genómica por ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica humana, tratados con teofilina (0,02, 0,2 y 2 mM) o fenoterol (0,1, 1 y 10 mM). En el presente trabajo no se encontró efecto citotóxico ni clastogénico en linfocitos de sangre periférica a las concentraciones de teofilina evaluadas. No se encontró efecto clastogénico a las concentraciones de 0,1 y 1 mM utilizadas en los protocolos de maduración *in vitro* de oocitos, pero se encontró un fuerte efecto clastogénico a la concentración de 10 mM.

**SUMMARY.** "In vitro study of Clastogenicity of Theophylline and Fenoterol in Human Lymphocytes". In vitro maturation of oocytes is a critical step in the *in vitro* embryo production and for this reason new protocols to optimize that process has been developed. Theophylline and fenoterol in oocytes trigger fundamental process in nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes. Both substances are mainly used in humans as broncodilators in obstructive airway diseases, such as bronchial asthma, and for myocardial and nervous central system stimulation. Both medicines has been proposed for substitution of gonadotrophins FSH and LH because their comparable action and low cost. Not obstant, some researchers have found genotoxic and mutagenic effects of theophylline, that can damage any cellular process by its capacity to affect the genic expression and their products, which could be result counterproductive in the *in vitro* maturation of oocytes protocol optimization. On the other hand, no reports have been found on the genotoxicity and mutagenicity of fenoterol; for this reason, the cytotoxicity by tripan blue exclusion of theophylline and the genomic integrity by comet assay of theophylline (0.02, 0.2 y 2 mM) and fenoterol (0.1, 1 y 10 mM) has been assessed in this study. We have not found cytotoxic and genotoxic effects of theophylline in periphery human lymphocytes. No clastogenic effects at the concentration 0.1 and 1 mM used in the *in vitro* maturation of oocytes were noted, but strong clastogenic effect at 10 mM was found.

### INTRODUCCIÓN

Con el propósito de aumentar la eficiencia reproductiva de la hembra bovina, desde hace más de 40 años se viene desarrollando la transferencia de embriones, técnica que tiene como

finalidad mejorar las características deseables de un hato ganadero, ya que a través del aumento del número de embriones y terneros, el potencial genético de la hembra puede emplearse con más eficiencia, lo cual facilita la implementación

**PALABRAS CLAVE:** Citotoxicidad, Clastogenicidad, Ensayo cometa, Fenoterol, Teofilina.

**KEY WORDS:** Cytotoxicity, Clastogenicity, Comet assay, Fenoterol, Theophylline.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: memarque@unalmed.edu.co

de programas de mejoramiento genético <sup>1</sup>. Lo anterior ha motivado el estudio y el desarrollo de la producción *in vitro* de embriones, pero debido a su baja eficiencia (30 a 40 % de blastocistos obtenidos), se han evaluado condiciones de cultivo *in vitro* de oocitos, con el objetivo de optimizar el proceso de maduración *in vitro* para aumentar las tasas de desarrollo embrionario <sup>2,3</sup>.

En las condiciones *in vivo*, el proceso de maduración de los oocitos está regulado por la acción de las gonadotropinas, Hormona Foliculo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), las cuales actúan sobre las células de la teca y de la granulosa (CG), estimulando la síntesis de sustancias requeridas para los procesos de maduración nuclear y citoplasmática durante la dinámica folicular <sup>4</sup>. Se ha reportado que uno de los moduladores más importantes para garantizar el sincronismo entre la maduración citoplasmática y la nuclear del oocito es el 17  $\beta$ -estradiol <sup>4-6</sup>, debido a que provoca una serie de oscilaciones intracelulares de calcio, que se han relacionado con altas tasas de desarrollo embrionario <sup>5</sup>. Igualmente, se ha reportado que en cerdos el desarrollo embrionario es mayor cuando se realiza un periodo de preincubación de los complejos cúmulos-oocito (CCO) por 12 h en ausencia de gonadotropina LH y en presencia de estrógenos como el 17 $\beta$ -estradiol, el cual estimula la maduración citoplasmática <sup>4</sup>. Por otro lado, se ha reportado que el patrón de síntesis de esteroides (17  $\beta$ -estradiol y progesterona) por células de la granulosa de bovino cultivadas *in vitro*, con medicamentos alternativos derivados de xantinas y  $\beta$ -adrenérgicos como la teofilina a 0.2 mM y el fenoterol 1 mM respectivamente, es superior al inducido utilizando la FSH <sup>3,7</sup>.

La teofilina (1,3 dimetilxantina), por su parte es un alcaloide encontrado en el té (*Thea sinensis*) y el chocolate y está estructuralmente relacionada con la cafeína y la teobromina; por su estructura se considera como un derivado de xantinas, metilxantina o metiloxipurina. Como droga es usada principalmente como estimulador del miocardio y como un broncodilatador en enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, como el asma bronquial <sup>3,10-12</sup>. La teofilina actúa inhibiendo las fosfodiesterasas (PDE), enzimas que operan degradando el AMPc a AMP <sup>13</sup>, conduciendo a un incremento de las concentraciones intracelulares de AMPc en células de la granulosa <sup>14</sup>, activando la PKA y desencadenando la cascada enzimática que estimula a

las células de la granulosa a secretar hormonas esteroideas como el 17 $\beta$ -estradiol.

El fenoterol es una droga usada para el tratamiento del asma <sup>9</sup> y se ha encontrado que es un eficiente secuestrador de radicales superóxido, siendo esta una de las ventajas de este medicamento en el tratamiento de pacientes asmáticos <sup>15</sup>. Además, se utiliza para controlar las contracciones uterinas no deseadas producidas por la oxitocina <sup>16,17</sup>. Por otro lado, el fenoterol se ha utilizado para mejorar la eficiencia en el aprovechamiento de la alimentación y potenciar el rendimiento en canal de la carne magra al sacrificio, en especies de interés pecuario <sup>18</sup>. El fenoterol actúa como agonista completo, estimulando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos <sup>19,20</sup>, utilizados por la FSH para activar la síntesis del segundo mensajero AMPc que a su vez estimula a las células de la granulosa a secretar hormonas esteroideas como el 17 $\beta$ -estradiol.

Ambos medicamentos son usados a nivel clínico y son de menor costo que las gonadotropinas y actúan incrementando las concentraciones intracelulares de AMPc en células de la granulosa, estimulándolas a secretar hormonas esteroideas como el 17 $\beta$ -estradiol, de importancia en la maduración citoplasmática. Además, este proceso induce en las células de la granulosa al cierre de las uniones *gap*, ocasionando la disminución en las concentraciones de AMPc en el oocito, activando mecanismos intracelulares de control del ciclo celular, induciendo a la fosforilación y desfosforilación de algunas proteínas que influyen en la condensación de la cromatina, estimulando la maduración nuclear <sup>21</sup>.

Por su amplio uso en humanos como agente farmacéutico, y por su relación con purinas como la cafeína, 1-metil-3-hidroxi-guanina y 3-hidroxi-1-metilxantina de los cuales se tiene reportes de genotoxicidad y teratogenicidad <sup>11,22</sup>, a la teofilina se le han realizado estudios genotóxicos donde se evidencia un incremento en el número de intercambios de cromátides hermanas (ICH) en medula ósea de ratón, su actividad mutagénica en test de Ames en las cepas de *Salmonella thyphimurium* TA102 y TA104 <sup>12</sup>, su capacidad de inducir quiebres de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos y en la línea celular V79 <sup>9</sup>. Del mismo modo, se ha reportado incremento de ICH y quiebres cromosómicos en linfocitos de individuos expuestos a teofilina <sup>23</sup>. En todos los estudios anteriormente reportados las concentraciones de teofilina fueron superiores a la de 0,2 mM, recomendada para la maduración *in vitro*

de los oocitos bovinos, en los protocolos de reproducción asistida. Por otro lado, los efectos secundarios comúnmente encontrados por el uso de la teofilina son la irritación gastrointestinal, dolor de cabeza, aumento de la frecuencia cardíaca, vértigo, disminución de la presión sanguínea, insomnio y vómito <sup>24</sup>. Debido a lo anterior y basados en reportes de teratogenicidad y toxicidad testicular se ha recomendado incluir estudios reproductivos en la evaluación de la teofilina <sup>11</sup>. De otro lado, no se tienen reportes de mutagenicidad y clastogenicidad del fenoterol, a pesar de ser un medicamento de uso farmacéutico.

Teniendo en cuenta que la teofilina y el fenoterol son promisorios para ser usados en programas de reproducción asistida, se requiere estudiar sus potenciales efectos adversos. Por esta razón, en este estudio se evaluó el efecto citotóxico de la teofilina por medio del colorante vital azul de tripano y la integridad genómica *in vitro* de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones de teofilina o fenoterol mediante la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa).

## METODOLOGÍA

### **Obtención y aislamiento de linfocitos humanos**

Los linfocitos fueron aislados de sangre periférica humana heparinizada, obtenida de donadores saludables, utilizando el método de separación por densidades con Hystopaque-1077 (SIGMA) como se describe a continuación: inicialmente, la sangre se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en una solución salina balanceada (PBS) en proporción 1:1. Posteriormente se adicionó 3 ml de Hystopaque-1077 (SIGMA), nuevamente se centrifugó a 2000 rpm por 30 min y se realizaron dos lavados con la misma solución salina. Finalmente las células se resuspendieron en 2 ml de PBS.

### **Tratamiento de las células**

Las suspensiones celulares de linfocitos aisladas fueron tratadas con teofilina (0,02, 0,2 y 2 mM) o fenoterol (0, 1 y 10 mM) a 4 °C durante 2 h. Para cada uno de los experimentos, se incluyeron controles negativo (10 µl de PBS) y

positivo (1% de Triton X-100 para la prueba de citotoxicidad de la teofilina y 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la prueba de genotoxicidad de ambas sustancias).

### **Prueba de Citotoxicidad de la teofilina en linfocitos humanos**

Para evaluar la citotoxicidad de la teofilina se utilizó la prueba de exclusión de colorante vital, con el colorante azul de tripano al 0,1%. Después de cada tratamiento se observaron y contabilizaron en el microscopio 100 células en un aumento de 40X y se determinó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de células vivas} \times 100}{\text{Total de células contadas}}$$

### **Prueba de Clastogenicidad de la teofilina y el fenoterol en linfocitos humanos**

Para evaluar el efecto clastogénico mediante el ensayo cometa se utilizó el protocolo propuesto por Singh *et al.* (1988) <sup>25</sup>. De cada tratamiento se utilizaron concentraciones de 2 X 10<sup>5</sup> células/ml suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (en PBS libre de Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>) en portaobjetos pretratados con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal al 0,5% (en PBS libre de Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>). Después de 6 min a 4 °C, los portaobjetos fueron colocados en solución de lisis (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-HCL 10% DMSO 1% de Triton X 100) pH 10, por 1 h a 4 °C; luego fueron incubados en Buffer de electroforesis (0,3 M NaOH, 200 mM, EDTA 1 mM, pH 13) por 30 min en un cuarto oscuro a 4 °C, luego se realizó el corrido electroforético, durante 30 min a 25 V y 300 mA. Los portaobjetos fueron lavados con Buffer neutralizante (0,4 M Tris-HCL; pH 7,5), coloreados con bromuro de etidio (20 µg/ml), visualizados en un microscopio Olympus provisto por un sistema de fluorescencia y fotografiadas con una cámara digital Pixera modelo VCS 10132.

Finalmente, las imágenes fueron analizadas con el programa CASP (*Commet Assay Software Project*), <sup>26</sup> para medir las imágenes de los cometas y cuantificar el daño en el ADN por medio de la variable Momento de la cola Olive (Olive Tail Moment, OTM):

$$OTM = \frac{\text{distancia (centro gravedad cabeza en dirección } x \text{ - centro de gravedad cola en dirección } x)}{\% \text{ de DNA cola}}$$

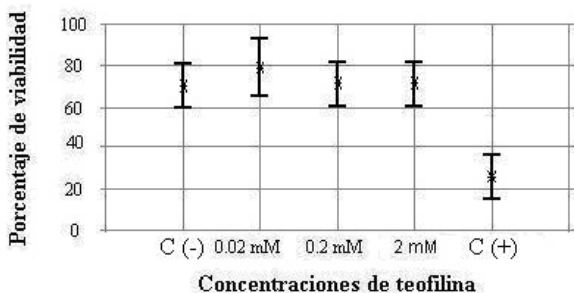
**Análisis estadístico**

Para ambos tipos de pruebas, citotóxica y genotóxica, los datos se generaron con base en un diseño de bloques completos al azar, tomando la muestra de cada donante como factor de bloqueo. Se evaluaron cinco tratamientos para cada sustancia: tres concentraciones de teofilina o fenoterol y dos controles, uno positivo y uno negativo. Los análisis de varianza y las correspondientes pruebas de medias (Duncan) se realizaron con ayuda del software estadístico Statgraphics Plus, versión 2.1.

**RESULTADOS**

**Citotoxicidad de la teofilina en linfocitos humanos**

No se encontró efecto citotóxico de la teofilina en ninguna de las concentraciones evaluadas, lo cual se evidencia en que no se encontró diferencia significativa entre el control negativo y las concentraciones de teofilina evaluadas, pero sí se encontró un efecto significativo entre las concentraciones de teofilina evaluadas y el control positivo ( $p = 0,0000$ ), como se puede observar en la Figura 1.

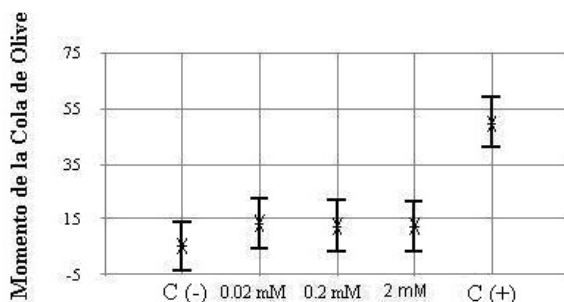


**Figura 1.** Comparación de medias para porcentaje de viabilidad. C (-) corresponde al control negativo realizado con 10 µl de PBS, C (+) corresponde al control positivo realizado con de Triton X- 100 al 1%.

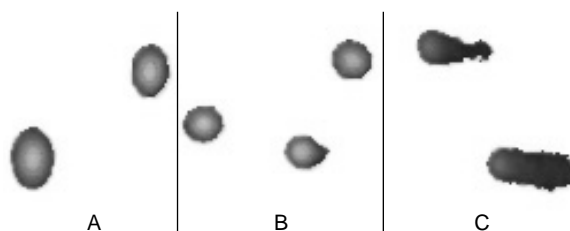
**Clastogenicidad de la teofilina y el fenoterol en linfocitos humanos**

No se encontró efecto clastogénico de la teofilina en ninguna de las concentraciones evaluadas, lo cual se evidencia en que no se encontró diferencia significativa entre el control negativo y las concentraciones de teofilina evaluadas, pero si se encontró un efecto significativo entre las concentraciones de teofilina evaluadas y el control positivo ( $p = 0,0004$ ), como se puede observar en las Figuras 2 y 3.

Bajo las condiciones en que se realizaron los ensayos no se encontró diferencia significativa entre el control negativo y las concentraciones



**Figura 2.** Comparación de las medias para momento de la cola Olive. C (-) corresponde al control negativo realizado con 10 µl de PBS, C (+) corresponde al control positivo realizado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM).



**Figura 3.** A. ADN de linfocitos correspondientes al control negativo (10 µl de PBS), B. ADN de linfocitos correspondientes a la concentración de 2 mM de teofilina, C. ADN de linfocitos correspondientes al control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM).

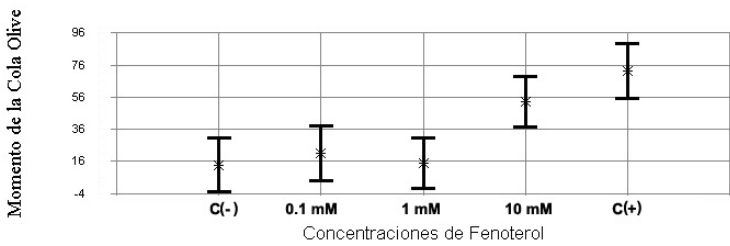
de 0,1 y 1 mM de fenoterol (Figura 4), lo cual evidencia que a estas concentraciones no tienen efecto clastogénico las concentraciones recomendadas para la maduración *in vitro* de oocitos. Por otro lado, se encontró diferencia significativa entre la concentración de 10 mM de fenoterol con el control negativo y no se encontró diferencia significativa con el control positivo, lo cual evidencia su efecto genotóxico a esta concentración. Estos resultados sugieren que las concentraciones recomendadas para los protocolos de maduración *in vitro* de oocitos bovinos pueden ser usadas sin riesgo de generar clastogenicidad; no obstante deben ser evaluados con otras pruebas mutagénicas y genotóxicas que permitan dilucidar completamente su efecto sobre el oocito bovino madurado *in vitro* con estos medicamentos.

En la Figura 5 se pueden observar las migraciones típicas del ADN de los núcleos de linfocitos a los diferentes tratamientos.

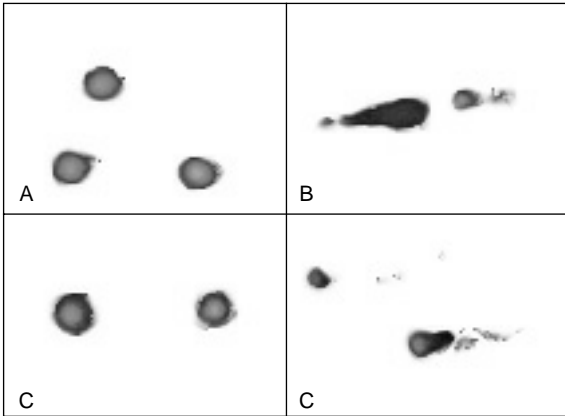
**DISCUSIÓN**

**Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos**

En el presente estudio, se demostró que las concentraciones de teofilina 0,02 mM, 0,2 mM y



**Figura 4.** Comparación de las medias para momento de la cola Olive de las diferentes concentraciones de fenoterol 0.1, 1 y 10 mM, C (-) corresponde al control negativo realizado con 10 µl de PBS, C (+) corresponde al control positivo realizado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM).



**Figura 5.** A. Control negativo (10 µl de PBS), B. Control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM), C. 0.1 y 1 mM de fenoterol, D. 10 mM de fenoterol.

2 mM no tienen un efecto citotóxico ni genotóxico sobre linfocitos de sangre periférica humana y esto se evidencia en que no hubo una diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad detectado por la técnica de exclusión de colorante vital azul de tripano, ni daño de ADN detectado por ensayo cometa entre los controles negativo y los diferentes tratamientos con teofilina, pero sí hubo diferencia significativa entre los tratamientos con teofilina y los controles positivos, como se muestra en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

Aunque algunos autores han reportado un efecto genotóxico en pacientes tratados con teofilina<sup>23,27</sup>, un leve efecto mutagénico con el test de Ames en las cepas de *Salmonella thyphimurium* TA102 y TA104 y un aumento significativo de ICH en células de médula ósea de ratón<sup>12</sup>, nuestros resultados se validan con los hallazgos reportados por Slamenová *et al.*<sup>10</sup>, quien evaluó la teofilina en la línea celular V79 y en linfocitos humanos, donde se muestra su efecto clastogénico sólo a concentraciones mayores de 2 mM, la mayor concentración utilizada en este trabajo.

En el caso del fenoterol, la concentración de 1 mM que es la usada en la maduración *in vitro*, no mostró daño clastogénico, por esta razón se debe evaluar a nivel mutagénico con pruebas como la mutación HGPRT o el test de Ames pa-

ra recomendar su uso en programas de reproducción asistida.

En el presente estudio, el hecho de no haber encontrado daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica humana se debe tal vez a que las condiciones en las que se realizó el tratamiento de las células (un periodo de incubación de dos horas a 4 °C y sin estímulo mitogénico) permiten evaluar daño neto en el ADN de células no replicativas; esto respalda la hipótesis planteada por Slamenová *et al.*<sup>10</sup> que sugiere que el mecanismo por el cual la teofilina induce quiebres en cadena sencilla y aberraciones cromosómicas es por la inhibición de la elongación de las cadenas de ADN, lo cual se puede evidenciar en células en fase replicativa tratadas con teofilina.

Se recomienda realizar estudios de la teofilina y fenoterol con otras pruebas genotóxicas ampliamente reconocidas como el ICH, la mutación HGPRT, el test de Ames, y se sugiere utilizar una fuente más homogénea de provisión de oocitos para realizar el estudio.

**Agradecimientos.** A los individuos que donaron sangre y a la Central Ganadera de Medellín, al Colegio Mayor de Antioquia y al Laboratorio de Materiales Cerámicos y Vítreos. La División de Investigaciones (DIME) la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Palma. G.A. & G. Bream (1993) *Transferencia de Embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
2. Beker A.R., B. Colenbrander & M.M. Bevers (2002) *Theriogenology* **58**: 1663-73.
3. A`arabi, S.Y., J.D. Roussel, & J.E. Chandler (1997) *Theriogenology* **48**: 1173-1183.
4. Funahashi, H., Cantley, T.C. & B.N. Day (1997) *Theriogenology* **47**: 679-86.
5. Tesarik, J. & C. Mendoza (1995) *J. Clin. Endoc. Metab.* **80**: 1438-43.
6. Filicori, M. (1999) *Fertil. Steril.* **71**: 405-14.
7. Vásquez, N. (1999) *Fenoterol y Teofilina Como*

- Agentes Alternativos a las Gonadotropinas para Modular la Respuesta Esteroidogénicas.* Tesis Maestría de Ciencias Básicas Biomédicas, Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Medellín. Pág. 45.
8. Aguado, L.I, S.L Petrovic & S.R. Ojeda (1982) *Endocrinology* **110**: 1124-32.
  9. Eggleston, P.A., P.P. Beasley & R.T. Kindley (1981) *Chest* **79**: 399-405.
  10. Slameňová, D., I.Chalupa, A. Gabelová, E. Bozsakyová, E. Horvátthová & M. Blaško (1995) *ATLA* **23**: 504-12.
  11. National Toxicology Program. U.S. Department of Health and Human Services (1998) *Toxicology and Carcinogenesis studies of Theophylline*. NIH Publication N° 98-3963.
  12. Giri, A.K, M. Das, V.G.Reddy & A.K. Pal (1999) *Mutat Res.* **444**: 17-23.
  13. Conti, M., G. Nemoz, C. Sette & E. Vicini, (1995) *Endocr. Rev.* **16**: 370-89.
  14. Tsafiriri, A., S.Y.Chun, R.Zhang, A.J. Hsueh & M. Conti (1996) *Dev. Biol.* **178**: 393-402.
  15. Zwicker, K., W. Damerau, S. Dikalov, H. Scholtyssek, I. Schimke & G. Zimmer (1998) *Biochem. Pharmacol.* **56**: 301-5.
  16. Lipshitz, J. & P. Baillie (1976) *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **83**: 864-9.
  17. Gerhard, I., R. Henninger, T. von Holst, B. Runnebaum & F. Kubli (1989) *Z. Geburtshilfe Perinatol.* **193**: 51-9.
  18. Smith, D.J. (1998) *J. Anim. Sci.* **76**: 173-94.
  19. Hardman, J.G., L.E. Limbird, B. Molinoff & R.W. Ruddon, eds. (1996) *Goodman and Gilman. The pharmacological basis of therapeutics.* 9ª ed. Mc Graw Hill, New York.
  20. Bremner, J.B., B. Coban, & R. Griffith (1996) *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **10**: 545-57.
  21. Sirard, M.A. (2001) *Theriogenology* **55**: 1241-54.
  22. Mailhes, J.B., D. Young, & S.N. London (1996) *Mutagenesis* **11**: 395-9.
  23. Day, P., Z. Shalaby, M.M. Cohen, S.S. Wasserman & S. Schwartz (1989) *Mutat. Res.* **224**: 409-13.
  24. Tarka, S.M. Jr. (1982) *Crit. Rev. Toxicol.* **9**: 275-312.
  25. Singh, N.P., M.T. Mc Coy, R.R.Tice & E.L. Schneider (1988) *Exp. Cell Res.* **175**: 184-91.
  26. Konca, K., A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gozdz, Z. Koza & A. Wojcik (2003) *Mutat. Res.* **534**: 15-20.
  27. Sinuses, B., A. Broto, M.A. Suarez, F. Duce, A. Martinez- Berganza & M.L. Bernal (1992) *Mut. Res.* **280**: 271-7.