

Camu camu (*myrciaria dubia* h.b.k. mc vaugh) contrarresta el efecto genotóxico de la contaminación ambiental en niños de edad escolar - prueba en vivo de micronúcleos

(Camu camu (*myrciaria dubia* h.b.k. mc vaugh) contrarests the genotoxic effect of environmental pollution on school-age students - test in vivo of micronucleus)

J.Pino G.¹, N.Salas de la T.², R. Alvis,^{1,3} R. Lengua C.²,
V.Caja R.², A. Castro C.²

Resumen

La contaminación ambiental es parte inherente en las actividades del hombre. El ser humano es un excelente agente de cambio en el planeta y no escapa a los efectos de la destrucción que él mismo provoca; introduciendo al ambiente decenas de miles de compuestos químicos agregando cada año al mercado otros nuevos, la mayoría de los cuales no han sido evaluados comprensivamente respecto a su toxicidad y posible impacto ambiental. Esos cambios son el producto de situaciones tales como la eliminación selectiva de especies y la alteración de los hábitats. Es imperiosa la necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema. Una alternativa es considerar el uso de bioindicadores, los cuales proveen la posibilidad de obtener información sobre las moléculas contaminantes, después de su vertido en el ambiente, directamente sobre sus receptores biológicos. El instrumento metodológico más desarrollado por el enfoque directo está representado por los biomarcadores, definidos como variaciones inducidas cuantificables de tipo bioquímico celular y fisiológico. Es así que el objetivo de este estudio es evaluar el Daño Genotóxico en niños de edad escolar por Efectos de la Contaminación Atmosférica, a través del Test de Micronúcleos (MN) que consiste en la determinación de alteraciones nucleares, detectando lesiones a nivel citogenético. Se comparó los valores obtenidos de daño en el DNA para cada individuo y para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA, con un valor de significancia del 95% de confiabilidad.

Palabras claves

Genotoxicidad, micronúcleo, camu camu, bebida nutraceútica, contaminación ambiental.

1 Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, F. Biología-UNMSM, jpinog@unmsm.edu.pe

2 Facultad de Química e Ingeniería Química- UNMSM. Docente U.R.P.

3 Laboratorio de Biología, Universidad Científica del Sur, rafael_alvis@hotmail.com

Abstract

Environmental contamination is inherent in the activities of man. The human being is an excellent agent of change on the planet and does not escape the effects of the destruction he causes, introducing in the environment thousands of chemical compounds and adding to the market each year new ones, most of which have not been comprehensively evaluated for their toxicity and potential environmental impact.

These changes are the result of situations such as the selective removal of species and habitat alteration. There is an urgent need to assess and detect the impact of human activities on the organisms and their ecosystem. An alternative is to consider the use of biomarkers, which can provide information on pollutant molecules after discharge into the environment, directly on their biological receptors.

The methodological tool developed by the most direct approach is represented by biomarkers, defined as measurable changes induced cellular biochemical and physiological types. Thus the aim of this study is to evaluate the genotoxic damage in school-age children Effects of Air Pollution, through the micronucleus test (MN) consisting of the determination of nuclear alterations, detecting lesions at a cytogenetics level. We compared the values of DNA damage for each individual and for statistical analysis ANOVA was applied with a significance value of 95% reliability.

Key words

genotoxicity, micronucleus, camu camu, nutraceutical beverage, pollution contamination

Introducción

Desde que el hombre desarrolló su capacidad para cambiar su entorno ha generado modificaciones en la naturaleza en mayor o menor medida, siendo la contaminación un producto de su afán por "mejorar" su calidad de vida.

Hasta hace algunas décadas se pensaba que dicha contaminación era producida solo por las sociedades industrializadas, sin embargo a principios de los 70 adquirió mayor relevancia en los grandes centros urbanizados de los países en desarrollo. Entre las causas de esta forma de impacto ambiental se encuentran la utilización de combustibles impuros, el parque vehicular y la deficiencia en su mantenimiento, la intensidad energética en los procesos industriales y la falta de reglamentos eficaces en materia de calidad del aire, entre otras.3,5,8

Los contaminantes atmosféricos considerados en las normas de calidad del aire a nivel internacional son: partículas suspendidas (PS), plomo (Pb), monóxido de carbono (CO), óxidos de azufre (SO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x) e hidrocarburos y oxidantes fotoquímicos; los 6 primeros son emitidos en forma directa por la combustión, los procesos industriales, la erosión y los incendios (Bravo, 1987; Quadri de la Torre & Sánchez-Cataño, 1994). La contaminación ambiental producida por el parque automotor en la Ciudad de Lima, es un fenómeno que se presenta, sobre todo, por la acumulación de gases tóxicos producidos por los motores de explosión y que por consiguiente contaminan el aire, el cual a su vez al ser inhalado por las personas y animales mediante la respiración, los predisponen a algunos tipos de cáncer, incluido el de los pulmones y

Silverman, et al. 1986; Balarajan, and McDowall, 1988; Hayes, et al. 1989; Guberan, et al. 1992; Steenland et al., 1992; Barbone et al., 1995; Jakobsson et al., 1997; Soll-Johanning et al., 1998; MacGregor et al., 1990). 7,14,15,17

También se presentan enfermedades en la piel y daño citogenético en células de mamíferos in vitro e in vivo (Hayashi, et al., 1990)11 así como el consiguiente deterioro al sistema ecológico natural, que durante años se han reportado daños de diversa índole en la vegetación, provocados por la contaminación atmosférica (Bauer, 1972); sin embargo el efecto que pudiera tener en estos organismos no ha sido evaluado exhaustivamente.

Por consiguiente, está claro, el gran impacto en la salud de las enfermedades genéticas que se pueden manifestar, y que hay que dedicar todos los esfuerzos posibles para minimizar la exposición a los mutágenos ambientales que pueden conducir al desarrollo de las mismas (Perera et al., 1992). Para detectar daño en el DNA que sea indicativo de riesgo genético, podemos estudiar las células de la línea germinal (estudiadas durante décadas, ya que las mutaciones en las mismas son causante de enfermedades y alteraciones genéticas en las futuras generaciones), y la línea somática, en donde las mutaciones están implicadas en el cáncer y el envejecimiento, entre otros efectos adversos para la salud (Parry et al., 1997). También es importante recalcar que las mutaciones somáticas no sólo están relacionadas con acontecimientos tumorales, sino también con otras patologías como el incremento de placas ateroscleróticas asociadas a las enfermedades cardiovasculares, las cataratas seniles, y las metaplasias de estómago e intestino (Hagmar et al., 1994)6,11,16.

Debido a la alta biodiversidad de áreas tropicales y subtropicales, latinoamérica tiene muchas plantas ricas en compuestos químicos, entre los cuales los antioxidantes son actualmente estudiados mundialmente por sus propiedades citoprotectoras12,13.

Camu Camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) 1,4,9 pertenece a la familia Myrtaceae, género *Myrciaria*; es un frutal arbustivo que crece en las orillas anegables de los ríos Ucayali, Amazonas y sus afluentes, en el sector ubicado entre las localidades de Pucallpa (sobre el río Ucayali) y Pebas (sobre el río Amazonas) del nor-oriente del Perú (Pinedo, 2004). Mendoza et al., (1989) mediante una prospección de tejidos de germoplasma efectuada en el INIA, Perú, concluye que las zonas donde se observa la mayor concentración de poblaciones naturales son la quebrada del Supay, tributario del Bajo Ucayali y el río Nanay, tributario del Alto Amazonas; por otra parte, (Mendoza et al., 1989). Chávez (1993) indica que el camu camu se encuentra a lo largo del río Amazonas hasta el estado de Amazonas en Brasil, así como en la cuenca superior del río Orinoco, y en el estado de Rondonia, Brasil. Camu camu posee un alto contenido de ácido ascórbico (AsA) (entre 2100-4000 mg/100 g de pulpa) según investigaciones realizadas con muestras de Brasil (Justi et al., 2000) y Perú (Salas et al., 2009; Guija et al., 2005; Ascuña et al., 1997). El AsA es un potente antioxidante soluble en agua el cual elimina de manera eficaz los radicales libres (Frei, 1989). Además se ha reportado la presencia de polifenólicos que constituyen un importante grupo de antioxidantes que comprende a los flavonoides, antraquinonas, cromonas, cumarinas en este fruto, los cuales optimizan la acción del AsA (Guija, et al., 2005; Ramberg, 2003). Diversos estudios vienen demostrando las propiedades antimutagénicas (Ghaskadbi et al; 1989; Khan et al., 1993; Kojima et al; 1992), antigenotóxicas (Khouri et al., 2005; Hoda et al; 1993); anticlastogénicas (Vijayalaxmi et al; 1999) del ácido ascórbico

Khan & Sinha, 1993).12,13,18,23 Sin embargo, a lo largo del tiempo, estos radicales libres contribuyen al daño del ADN y a la posibilidad de generar mutación y cáncer. Bajos niveles de radicales de oxígeno actúan, también, como segundos mensajeros, como en la activación de la forma citoplásmica del factor de transcripción NF-k B (Reitter, 1995). Normalmente, los sistemas antioxidantes del organismo permiten esas funciones necesarias de los radicales de oxígeno y evitan los efectos tóxicos de los mismos. El bombardeo persistente de moléculas de ERO'S se llama estrés oxidativo, mientras que la destrucción molecular producida por el ataque de los radicales libres se llama daño oxidativo (Pierrefiche & Laborit, 1995)24,28.

Parte experimental

Población estudiantil: Se seleccionaron alumnos (8 a 12 años de edad) de las secciones de primaria (Tabla 2 y 3) del Centro educativo Particular Magister, ubicada en Centro Poblado Santa María de Huachipa - San Juan de Lurigancho. Se escogieron solo aquellos que después de una encuesta personal no tenían antecedentes de enfermedades crónicas, hereditarias, padres fumadores o ingesta de fármacos.

Planta: Las muestras del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) se colectaron en la ciudad de Pucallpa e Iquitos, la cual fueron enviadas a la ciudad de Lima para su identificación usando las claves vigentes. Mediante un procedimiento (Salas et al., 2009) se preparó una bebida nutracéutica utilizando la pulpa del camu camu y la de piña.

Químicos. Metanol absoluto de Carlo Erba (Italia); Suero Albúmina de Bovino (BSA), Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7.2, y May Grunwald - Giemsa fueron suministrados por Sigma, buffer Tris - EDTA.

Tratamiento. La bebida nutracéutica se administro vía oral desde la primera colecta de células epiteliales bucales, diariamente por un periodo de 30 días a la misma hora (desayuno), supervisado por el docente de aula. Aquel alumno que durante el tratamiento contraía alguna enfermedad infecciosa, era descartado del grupo.

Análisis de Micronúcleos:

Toma de muestras biológicas:

Las células de descamación de la mucosa bucal se obtuvieron raspando el interior de las mejillas con un hisopo estéril. Estas muestras fueron inmediatamente homogenizadas en 2 mL de solución tampón PBS (solución salina fosfatada). Luego fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. En donde se procedió a su análisis y evaluación. El protocolo aplicado se detalla a continuación.

Test de Micronúcleos (MN) en células Epiteliales de la Mucosa Bucal:

Las muestras de mucosa bucal se centrifugaron durante 20 minutos a 1250 r.r.p, se aspiró el sobrenadante y añadieron 1,5 mL de PBS. Se realizaron 4 lavados más, añadieron 1,5 mL de tampón (0,1M EDTA, 0,01M tris-HCl, 0,02 M NaCl, pH = 7) y centrifugó durante 10 minutos a 1250 rrp. Acabado el cuarto lavado, se aspiró el sobrenadante dejando una cantidad suficiente de tampón. Para proceder hacer el preparado de las láminas se realizó, la técnica del goteo en 2 portaobjetos por muestra y luego se calentó a 40 °C por 15 minutos, secados, se introdujeron en metanol al 100% durante 2 minutos a 0°C, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se observaron al microscopio de contraste de fases para comprobar si habían células.

La evaluación de la mucosa bucal se realizó mediante observación microscópica de campo claro, en un microscopio óptico Carl Zeiss Jena modelo Amplival con un aumento de 1000X. Los portaobjetos fueron previamente codificados, para realizar el estudio "a ciegas". Las muestras se tiñeron con Giemsa al 5 %. De cada muestra se evaluaron 1000 células mononucleadas, siguiendo los criterios para la evaluación de los MN propuestos por Titenko-Holland (1998). Se tomaron fotos digitales con una cámara Canon Powershot S50, adaptado al microscopio.

Evaluación Estadística:

Primero se comprobó si tenía una distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov; Luego del análisis para verificar la normalidad, se procedió con los Test Bonferroni y Tukey, respectivamente para comparar la frecuencia de Micronúcleos y aberraciones nucleares presentes en las células de descamación bucal. Con un nivel de significancia ($p < 0,05$).

Resultados

Según el patrón de clasificación para determinar el daño en el DNA no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos muestreos y para los cuatro parámetros de estudio. En la tabla 1,

TablaNº 1. Análisis de Micronúcleos en escolares de la zona de Huachipa

	Micronúcleos	Cariolisis	Cariorrexis	Picnosis
Toma de muestras (16/11/09)	17 ± 1,029	22 ± 1,053	23 ± 1,222	14 ± 1,044
Toma de muestras (16/12/09)	16 ± 0,810	24 ± 1,274	22 ± 1,053	16 ± 0,952

* $p < 0,05$ Toma de muestras (16/11/09) vs Toma de muestras (16/11/09);
Prueba paramétrica de Tukey.

Tabla N° 2. Análisis de Micronúcleos por año de estudio

Toma muestras (16/11/09)	Micronúcleos	Cariolisis	Carriorexix	Picnosis
1er	6 ± 1,303	5 ± 1,000	2 ± 0,547	5 ± 1,414
2do	3 ± 1,500	2 ± 1,000	3 ± 0,957	1 ± 0,500
3er	1 ± 0,707	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
4to	5 ± 0,951	11 ± ,272	8 ± 1,214	4 ± 1,133
5to	0 ± 0	2 ± 1,414	3 ± 0,707	1 ± 0,707
6to	2 ± 0,894	2 ± 0,547	7 ± 2,073	3 ± 1,341

*p<0,05 Tomade muestras (16/11/09) vs Toma de muestras (16/11/09); Prueba paramétrica de Tukey.

Tabla N° 3. Análisis de Micronúcleos por año de estudio

Toma muestras (16/12/09)	Micronúcleos	Cariolisis	Carriorexix	Picnosis
1er	2 ± 0,547	2 ± 0,547	6 ± 1,095	4 ± 0,836
2do	1 ± 0,500	7 ± 2,061	6 ± 1,290	2 ± 0,577
3er	1 ± 0,707	5 ± 2,121	2 ± 0,000	3 ± 2,121
4to	5 ± 0,755	8 ± 1,069	3 ± 1,133	1 ± 0,377
5to	3 ± 2,121	1 ± 0,707	2 ± 1,414	3 ± 2,121
6to	4 ± 0,836	1 ± 0,447	3 ± 0,894	3 ± 0,894

* p <0,05 Toma de muestras (16/11/09) vs Toma de muestras (16/11/09); Prueba paramétrica de Tukey.

Discusión

El hecho que un porcentaje muy elevado de los cánceres tenga origen epitelial (Cairns, 1975) sugiere que el ensayo de MN en células epiteliales tenga un enorme potencial epidemiológico. El primer ensayo MN con células de exfoliación fue Stich y col., a principios de los 80, quienes utilizaron células de la mucosa bucal para evaluar los efectos genotóxicos de la exposición al tabaco (Stich et al., 1982; Stich y Rosin, 1983). A diferencia de otros tipos celulares, el epitelio está formado por varias capas de células que se van exfoliando a medida que alcanzan la superficie, por lo que el daño genético detectado ha ocurrido en las capas basales, el lugar en donde las células se han dividido. Pero la rápida renovación de los tejidos epiteliales hace que el máximo índice de formación de MN aparezca entre 1 y 3 semanas después de la exposición al agente genotóxico (Stich & Rosin, 1983; Fenech y col., 1999), que será el tiempo necesario para que las células migren desde las capas basales del epitelio hasta la superficie. Se han realizado diversos estudios de biomonitorización mediante el ensayo de MN con células de exfoliación de diferentes órganos, como los que analizan la relación entre el consumo de tabaco (en sus diferentes formas), la incidencia de diversos cánceres y el incremento de daño genético en la mucosa bucal y en las células de exfoliación de la vejiga de la

orina (Nair et al., 1991; Burgaz et al., 1995). El ensayo de MN en células de exfoliación se ha utilizado también para evaluar poblaciones ocupacionalmente expuestas a diversas genotoxinas tales como el formaldehído (Titenko-Holland et al., 1996), el arsénico (Gonsebatt et al., 1997), y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Karahalil et al., 1999), entre otros. También se ha utilizado para evaluar el daño genético en pacientes con diversas enfermedades asociadas a deficiencias en los mecanismos de reparación como, por ejemplo, el xeroderma pigmentosum (Rosin et al., 1994). El ensayo de micronúcleos con células de exfoliación se ha utilizado con éxito en la identificación de agentes quimiopreventivos o anticarcinogénicos (Prasad et al., 1995), demostrando una vez más su versatilidad.

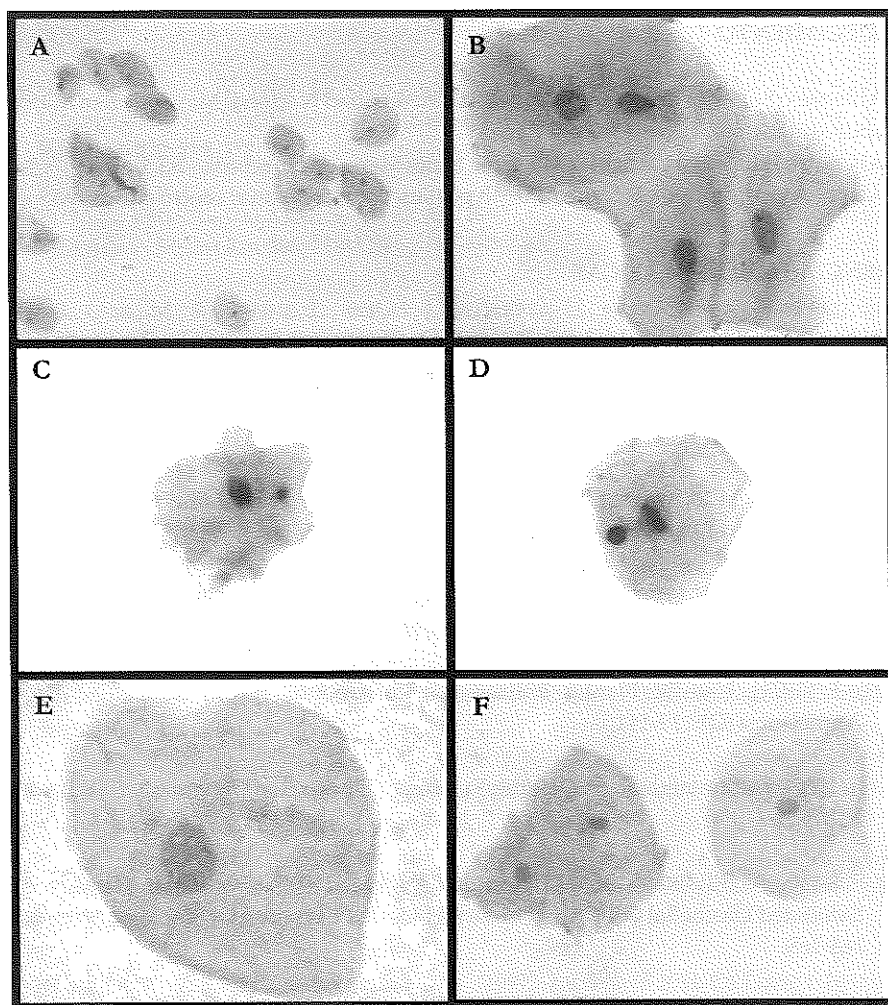


Figura Nº 1. Test de Micronúcleos obtenida de células de la mucosa bucal. A y B) Células normales. C y D) célula con Micronúcleos , E) Célula con daño en el núcleo (cariólisis) F) Célula con apoptosis nuclear (picnosis). Coloración Giemsa - May Grunwald.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que existe un mayor daño basal en el ADN, en células de descamación de la mucosa oral. Sin embargo, es difícil precisar el tipo específico de daño que se refleja en el test de MN, por el lapso corto de evaluación realizada. Ya que no se observó diferencias significativas después de la primera evaluación. O bien, los daños observados para los diferentes daños nucleares, para ambas evaluaciones pueden que se traten de daños estructurales en la cromatina propios del envejecimiento celular.

AGRADECIMIENTO

- Al consejo Superior de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo financiero.
- Al Centro Educativo Particular Magister, Santa María de Huachipa – S.J. L.
- Al Ingeniero Edmundo Estrada Alarcón por sus contactos con el centro educativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCUÑA, Y., LIRA, J. Y MOURAO, M. 1997. Proyecto De Prefactibilidad Para La Producción De Pulpa De Camu-Camu (*Myrciaria Dubia* H.B.K. Mc Vaugh) En Pucallpa. Ciclo Optativo De Profesionalización En Gestión Agrícola Empresarial. Universidad Agraria La Molina. Perú. 148 Pp.
- BALARAJAN, R., AND MCDOWALL, M. E. (1988). Professional Drivers In London: A Mortality Study. *Br. J. Ind. Med.*, 45: 483-486.
- BARBONE, F., BOVENZI, M., CAVALLIERI, F., AND STANTA, G. (1995). Air Pollution And Lung Cancer In Trieste, Italy. *Am. J. Ind. Med.*, 141: 1161-1169.
- BAUER, L. I. (1972). Uso De Plantas Indicadoras De Aeropolutos En La Ciudad De México. *Agrociencia (D)*:139-141.
- BRAVO, H. (1987). La Contaminación Del Aire En México. Fundación Universo XXI (Ed). México, D. F., 296 Pp.
- BURGAS S, ISCAN A, BÜYÜKBİNGÖL ZK, BOZKURT A ET AL. (1995). Evaluation Of Micronuclei In Exfoliated Urothelial Cells And Urinary Thioether Excretion Of Smokers. *Mutat. Res.* 335: 163-169.
- CAIRNS, J. (1975). Mutation Selection And The Natural History Of Cancer. *Nature* 255, 197-200.

CASELLI, M. (1995). La Contaminación Atmosférica. Causas Y Fuentes. Efectos Sobre El Clima, La Vegetación Y Los Animales. *Siglo Veintiuno (Ed.)*. 3a Ed. México. D.F. 192 Pp.

- CHATTERJEE, I., MUKHOPADHYAY, C., & M. GHOSH 1995. Vitamin C: A Potential Savior Against Free Radical Induced Oxidative Damage. *Current Science* 69 (9):747-751.
- CHÁVEZ, W. (1993). *Selected Species And Strategies To Enhance Income Generation From Amazonian Forests*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). Rome, May.
- FENECH M. (2000). The In Vitro Micronucleus Technique. *Mutation Res* 455: 81-95.
- FREI B. (1989). Ascorbate Is An Outstanding Antioxidant In Human Blood Plasma. *PNAS USA*; 86 6377-381.
- GHASKADBI, S & VAIDYA, V. 1989. In Vivo Antimutagenic Effect Of Ascorbic Acid Against The Mutagenicity Of The Common Antiamoebic Drug Diiodohydroxyquinoline. *Mutation Research* 222:219-222.
- GONSEBATT, M.E., VEGA, L., SALAZAR, A.M., ET AL (1997). Cytogenetic Effects In Human Exposure To Arsenic. *Mutat Res* 386: 219-228.
- GUBERAN, E., USEL, M., RAYMOND, L., BOLAY, J., FLORETTA, G., AND PUISSANT, J. (1992). Increased Risk For Lung Cancer And For Cancer Of The Gastrointestinal Tract Among Geneva Professional Drivers. *Br. J. Ind. Med.*, 49: 337-344.
- GUIJA, H., TRONCOSO, L. Y E. GUIJA. (2005). Propiedades Prooxidantes Del Camu Camu (*Myrciaria Dubia*). *An. Fac Med Lima* 66(4): 261-268.
- HAGMAR, L., A. BROGGER, I.L.HANSTEEN, S. ET AL., (1994). Cancer Risk In Human Predicted By Increased Levels Of Chromosomal Aberrations In Lymphocytes: Nordic Study Group On The Health Risk Of Chromosome Damage. *Cancer Res.* 54: 2919-2922
- HAYASHI, M., MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T. Y ISHIDATE, M. JR. (1990). The Micronucleus Assay With Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 245-249.
- HAYES, R. B., THOMAS, T., SILVERMAN, D. T., ET AL., (1989). Lung Cancer In Motor Exhaust-Related Occupations *Am. J. Ind. Med.*, 16: 685-695.
- HODA Q, SINHA S.P. (1993). Vitamin - C Mediated Minimisation Of Rogor Induced Genotoxicity. *Mutation Res.*; 229: 29 - 36.
- JAKOBSSON, R., GUSTAVSSON, P., AND LUNDBERG, I. (1997). Increased Risk Of Lung Cancer Among Male Professional Drivers In Urban But Not Rural Areas Of Sweden. *Occup. Environ. Med.*, 54: 189-193.

- JUSTI, K 2000. "Nutritional Composition And Vitamin C Stability In Stored Camu-Camu (*Myrciaria Dubia*) Pulp" *Archives Latinoamericans Nutrition*. 50(4):405-408.
- KARAHALIL, B., KARAHAYA, & A.E. BURGAZ. (1999). The Micronucleus Assay In Exfoliated Buccal Cells: Application To Occupational Exposure To Polycyclic Hydrocarbons. *Mut Res*. 442: 29-35.
- KHAN, P., SINHA, S. 1993. Antimutagenic Efficacy Of Higher Doses Of Vitamin C. *Mutation Research*. 298:157-161.
- KOJIMA, H., KONISHI, H. & KURODA, Y. 1992. Effects Of L-Ascorbic Acid On The Mutagenicity Of Ethylmethane Sulfonate In Cultured Mammalian Cells. *Mutation Research*. 266:85-91.
- KHOURI, J., RESCK, I., POÇAS-FONSECA, M., SOUSA, T., PEREIRA, L., OLIVEIRA, A. AND C. GRISOLIA. (2007). Anticlastogenic Potential And Antioxidant Effects Of An Aqueous Extract Of Pulp From The Pequi Tree (*Caryocar Brasiliense* Camb). *Gen Molec Biol* 30 (2): 442-448
- MACGREGOR, J.T., WEHR, C.M., HENIKA, P.R. Y SHELBY, M.E. (1990). The In Vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement At Steady State Increases Assay Efficiency And Permits Integration With Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol*. 14: 513-522.
- MENDOZA, O., C. PICÓN, J. GONZÁLES, ET AL. 1989. Informe De La Expedición De Recolección De Germoplasma De Camu Camu (*Myrciaria Dubia*) En La Amazonía Peruana. Informe Técnico N° 11. Programa De Investigación En Cultivos Tropicales. INIA. Lima. 19 P.
- NAIR U, OBE G, NAIR J ET AL (1991). Evaluation Of Frequency Of Micronucleated Oral Mucosa Cells As A Marker For Genotoxic Damage In Chewers Of Betal Quid With Or Without Tobacco. *Mutat Res*, 26, 163-8.
- SALAS, N., ESTRADA, E., LENGUA, R., PINO, J., ALVIS, R., BAZÁN, G., BECERRA, E., SANDIVAR, J., CARHUANCHO, M., OSORIO, A Y V. CAJA. 2009. Proceso Para Obtener Bebida Nutraceútica A Partir De *Myrciaria Dubia* (Camu Camu) Orientado A Reducir Efecto Genotóxico En Niños De Edad Escolar. *Revista Peruana De Química E Ingeniería Química* 12(2): 34-42.