

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola ^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández ^{2*},

Dayisell Lazara Curveco Sánchez ^{3}**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Técnico Medio en Farmacia.

*Centro de Química Farmacéutica (COF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Centro de Productos Naturales (CPN, CNIC), Calle 198 e/19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

La espermatogénesis, es un proceso eficiente e importante para la continuación de las especies, una de sus características es que manifiesta gran resistencia al daño. En el sistema reproductivo de ratones se han descrito efectos sobre la espermatogénesis, proceso de diferenciación altamente especializado, que incluye una serie de cambios transcripcionales y morfológicos. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce y de la OMS, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas; dada su gran sensibilidad esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo. En este artículo se reporta la concentración espermática y frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides en ratones NMRI, así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg, mutágeno de referencia utilizado como control positivo. Se pudo concluir que la línea de ratón NMRI, constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos como son los incluidos en este trabajo, así como su sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida.

Palabras clave: Espontánea, inducida, morfología de la cabeza del espermatozoides, ratones NMRI, ciclofosfamida.

Abstract

Spontaneous and induced frequency of anomalies in the head sperm morphology in NMRI mice.

The spermatogenesis, is efficient and important process for the species continuous, one of its characteristics is that apparent great resistance to the damage. In the reproductive system of mice have been described on spermatogenesis effects, process of highly specialized differentiation that includes a series of transcriptional and morphology changes. Among the systems that are used to evaluate the damages happened in the germinal cells is the assays based on the Wyrobek and Bruce morphology approaches and the OMS, that which allows the study and classification of the head sperms morphology when including inside the classifications, normal, abnormal heads and inside this last banana form morphology, amorphous, without hook and two tail, given their great sensibility this tool allows to evaluate the spermatid concentration changes, as well as the increase of the heads spontaneous frequency of sperms morphology abnormal, to detect the irreversible damage that is fixed by a relatively long time period. In this article we reported the sperms concentration and basal frequency of appearance of anomalies in the head sperms in NMRI mice, as well as the events induced frequency after the cyclophosphamide administration by intraperitoneal route (50 mg/kg), mutagen reference used as positive control. We could conclude that the NMRI mice, constitutes a good model to use in the genotoxicology studies, given the drop spontaneous frequency of important genotoxic indicative like they are those included in this work, and the sensibility of the cyclophosphamide action.

Key words: Spontaneous, induced, head sperms morphology, NMRI mice, cyclophosphamide.

Introducción

El estudio del potencial genotóxico de nuevos compuestos propuestos como fármacos constituye una vía para la determinación del riesgo de daño genético en las personas expuestas. En este sentido la Toxicología Genética tiene la responsabilidad de determinar las sustancias que pueden ser potencialmente genotóxicas para el hombre, el cual posteriormente evaluará su uso o no, en función de la relación riesgo-beneficio.

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno.^{1,2} Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer.^{3, 4}

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad. La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo / beneficio los declare indeseables para la sociedad.^{4, 5}

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre.^{4, 6} En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante.⁷

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas el cual en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo.

La espermatogénesis, es un proceso eficiente e importante para la continuación de las especies, una de sus características es que manifiesta gran resistencia al daño. Esta técnica a su vez es sensible, rápida y económica lo cual justifica su uso. En el sistema reproductivo de ratones se han descrito efectos sobre la espermatogénesis, proceso de diferenciación altamente especializado, que incluye una serie de cambios transcripcionales y morfológicos.⁸

Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce y de la OMS, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoides al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas.⁹ Dentro de los ensayos de genotoxicidad dada por su gran sensibilidad esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo.¹⁰ Una ventaja importante de este sistema de ensayo es la posibilidad que brinda de poder comparar los resultados experimentales obtenidos en humanos y mamíferos expuestos a los mismos compuestos, lo cual resulta prácticamente imposible con otras metodologías, lo que le otorga por esta razón un considerable valor predictivo.¹¹

En este artículo se reporta la concentración de espermatozoides y la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides en ratones NMRI machos, así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.¹²

Materiales y Métodos

- Animales.

Se utilizaron ratones machos NMRI adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba.

- Administración y dosificación.

Ver Tabla 1

- Grupos experimentales incluidos:

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratones/grupo) en cada una de las tres series realizadas para un total de 30 ratones/grupo.

¹En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón).¹²

²En el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2%, el cual es un vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo, ¹³⁻¹⁵ administrado por vía oral durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón), ¹² preparado 2 horas antes de la administración.

³En el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9%, ya que está demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar, ^{16, 17} administrado por vía oral durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón), ¹² preparado 2 horas antes de la administración.

⁴En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF a una dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, Ciclofosfamida: n,n-bis(-cloruro de etilo)-n', o-esterdiamida del ácido fosfórico propinel (C₁₇H₁₅C₁₂N₂O₅P) fue adquirida a la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9%.¹⁸ La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales durante 5 días consecutivos y luego se dejó de administrar durante 35 días (tiempo de reposo, el cual coincide con la duración del ciclo espermático del ratón).¹⁹

- **Observaciones clínicas.**

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

- **Sacrificio.**

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en previa atmósfera de éter, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 35 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, el sacrificio se realizó 24 horas después de concluido los 35 días sin administrar,

para que de esta forma los espermatozoides a analizar fuesen los que estuvieron expuestos al mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.¹⁹

- **Exámenes realizados.**

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Una vez sacrificado los animales se realizó la extracción de ambos epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos mediante unas tijeras y fueron depositados en placas Petri que contenían 3 mL de solución isotónica de NaCl 0,9 %. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur.

Conteo de espermatozoides.

El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25 %, transcurridos cinco minutos de tripsinización se le añadió 2 mL más de NaCl 0,9 %, quedando como volumen final 5 ml, luego se realizó una dilución del homogenato tripsinizado en NaCl - Formol al 1 % (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2.^{20, 21}

Morfología del espermatozoide.

Al tubo que contenía la dilución del homogenato ya diluido se le añadió cinco gotas de eosina al 1 %, dejándolo reposar por cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto. Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides, las observaciones fueron realizadas por tres observadores independientes para luego establecer un promedio entre los tres, las mismas fueron realizadas "a ciegas". El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana y sin gancho, así como espermatozoides con dos colas.^{20, 22}

Análisis estadístico

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene). Por lo cual todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación, establecido fue α 0.05. Todos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y Discusión

En ninguna de las series experimentales tanto en los grupos control negativo como en los grupos tratados con las sustancias solventes 1 y 2 se encontraron animales con signos clínicos indicativos de toxicidad, no siendo así para los tratados con el control

positivo CF, ya que de un total de 30 animales se observaron 10 animales (33,3%), con pilo-erección a partir de los 20 días de administración.

Ver Tabla 2

Tal como se puede observar en la (Tabla 2), el tratamiento con Tween 65 al 2% y NaCl al 0,9% no indujo diferencias significativas al ser comparados con el control negativo en cuanto a la concentración espermática, tales sustancias se comportan similarmente a dicho control negativo en las tres series evaluadas obteniéndose una media entre la concentración de estos tres grupos de $2,06 \pm 0,4 \times 10^6$ células/mL, afirmando que en nuestro caso y por resultados dados por diversos autores en ratones NMRI y OF-1, ^{8,12,23-25} estos valores constituyen los rangos de frecuencia espontánea en que se mueve la concentración espermática en esta especie de ratones, a su vez pudimos llegar a la conclusión de que estas sustancias utilizadas como solvente no afectaron la proliferación de células germinales, no observándose tendencia a modificar este indicador. A diferencia de lo observado en los grupos tratados con las sustancias vehículo 1 y 2, la CF si indujo una disminución de la concentración de espermatozoides obteniéndose una media entre las tres series experimentales de $0,93 \pm 0,3 \times 10^6$ células/mL, tales resultados concuerda con los obtenidos en el uso de este mutágeno por nosotros y otros autores en ensayos realizados con ratas *SD* y ratones OF-1, ^{10,12} dados por resultados inducidos por sustancias altamente mutagénicas como la CF, ya que sus metabolitos logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo la producción y maduración de estas, reportado por todos los investigadores que usan este reconocido mutágeno como control positivo en este ensayo. ^{11,12,26} La dosis de CF empleada en los ensayos para evaluar el daño genotóxico, no es letal y ha demostrado su poder clastogénico y citotóxico en diferentes estudios realizados tanto en células somáticas como germinales. ^{8,10,12,18,27-30}

En cuanto a la morfología de la cabeza del espermatozoides observados en la (Tabla 3), en cada serie se analizaron 5 000 espermatozoides por grupo, para un total de 15 000 espermatozoides totales analizados en las tres series, dada la gran semejanza entre las medias y la no diferencia significativa existente entre el control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en cuanto al número de cabezas anómalas y sus clasificaciones, aparejado a la n analizada tan amplia podemos afirmar que el rango de cabezas anómalas en los espermatozoides de ratones NMRI bajo nuestras condiciones experimentales se encuentra entre 24,6-29,3 en conteo de 500 espermatozoides totales con una desviación entre 4,6-7,1 respectivamente, datos que concuerdan con los hallados por Piña y Aubele tras resultados obtenidos en sus investigaciones en el año 2005. ^{31,32} El tratamiento con CF, por su parte, indujo un incremento significativo de las formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoide, tal y como esta descrita para este mutágeno, estando en el rango de $99,2 \pm 6,2$ espermatozoides

anormales como promedio en las tres series experimentales, resultado que corrobora su uso como compuesto citotóxico y genotóxico en este modelo,^{9,33} a la par que valida la conducción de este ensayo en nuestras condiciones experimentales.

Conclusiones

Se pudo concluir que la línea de ratón NMRI, constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos como son los incluidos en este trabajo tales como la concentración espermática en epidídimos y la evaluación de la morfología de la cabeza del espermatozoide, así como se destacó la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía i.p durante 5 días consecutivos.

Tabla 1. Grupos experimentales en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones NMRI machos para las tres series, vía gástrica.

Grupos Experimentales	# de animales	Sustancia a administrar	Vía de administración	Volumen máximo a administrar ml/kg
¹ Control negativo	10	No tratado	Oral (Simulacro)	-
² Sustancia vehículo 1	10	(Tween 65, al 2%)	Oral	2
³ Sustancia vehículo 2	10	(NaCl 0,9%)	Oral	2
⁴ Control positivo	10	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15

Tabla 2. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones NMRI machos, vía gástrica.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	30	42,5 ± 3,1	2,13 ± 0,1
Sustancia vehículo 1	30	40,8 ± 4,3	2,04 ± 0,2
Sustancia vehículo 2	30	40,3 ± 2,9	2,01 ± 0,2
Control positivo (CF) ^a	30	18,7 ± 4,3*	0,93 ± 0,3*

CF (Ciclofosfamida).

^a Administración por vía i.p, durante 5 días.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA), (X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Tabla 3. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones NMRI machos, vía gástrica.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	30	475,4±4,6	24,6±4,6	13,1±4,5	1,3±0,5	10,0±2,6	0,3±0,3
Sustancia vehículo 1	30	473,2±7,1	26,8±7,1	13,1±3,6	1,4±0,9	12,3±5,3	0,1±0,2
Sustancia vehículo 2	30	470,8 ± 10,0	29,3 ± 5,0	12,6 ± 5,6	3,3 ± 3,4	12,9 ± 4,0	0,5 ± 0,2
Control positivo (CF) ^a	30	400,8 ± 6,2*	99,2 ± 6,2*	26,6 ± 7,5*	37,0 ± 3,1*	30,5 ± 7,3*	5,1 ± 0,6*

CF (Ciclofosfamida).

^a Administración por vía i.p, durante 5 días.

Determinaciones en 500 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA), (X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Referencias Bibliográficas

1. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar J.N, Poddar G, Nandy A.K, Banerjee A, Ray K, Natarajan A.T. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 534: 133-143.
2. Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular mutagenesis* 2003; 41: 85-91.
3. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39: 119-126.
4. Mortelmans K; Rupa Doppalapudi. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56: 379-397.
5. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hipótesis. *Journal Epidemiol* 2000; 134: 756-760.
6. Motelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 2000; 455: 29-60.
7. García-Peñalver L, Sureiro R.A, Garrido M. J. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental; 2000).p. 109-110.
8. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E.. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 2009; 40(1):29-32.
9. Wyrobek AJ. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.
10. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*. *Revista Española de Toxicología* 2009; 26(3), ISSN 0212-7113, en prensa.
11. Fielder R.J, Allen J.A, Boobis A.R, Botham P.A, Doe J, Esdaile D.J. Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in "In Vivo" Mutagenicity Assays. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagen* 1999; 4(3):313-319.
12. Betancourt J, Ramos A, Bizoso A, Decalo M, Martínez MJ, Edreira A. Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa Mill* (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides en ratón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1998; 3:58-61.

13. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res* 2004; 30:227-234.
14. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R&D* 2006; 7: 233-241.
15. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exptl Clin Rest* 2005; 31: 193-198.
16. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer, W. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat Sertoli cells. *Arch Androl* 2000; 44:147-154.
17. Shayne C.G. Animal Models in toxicology. Chapter 2, The Mouse. *Toxicology*. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p. 24-72
18. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. *Revista Cubana de Farmacia* 2009; 43 (2): 8-9.
19. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodríguez E. Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España: 2006; 1.p.2-3.
20. Wyrobek A.J, Bruce W.R. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection. Second edition, Vol 2, England: United Kingdom edition published; 1978.p.135-136.
21. Kempinas W.G, Lamano-Carvalho T.L. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat caudal epididymidis. *Lab. Animals* 1998; 22:154-156.
22. Mitchell A.D. Genetic Toxicology Testing. In: *Product Safety Evaluation Handbook*. Ed. U.S.A: Gad S.C.; Marcel Dekker, Inc edition; 1999.p.167-168.
23. Schardein J.L. *Product Safety Evaluation Handbook*. Reproductive Hazards. Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc, edition; 1999.p.299-233.
24. Gámez R, González J.E, Rodeiro I, Fernández I, Alemán C, Rodríguez M.D, Acosta P.C, García H. *In Vivo* Genotoxic Evaluation of D-003, a Mixture of Very Long Chain Aliphatic Acids. *Journal of Medicinal Food* 2001; 4(2): 85-91.
25. Garagna S, Vasco S.C, Merico V, Esposito A, Zuccotti M, Redi C.A. Effects of a low dose of bentazon on spermatogenesis of mice exposed during foetal, postnatal and adult life. [Toxicology](#) 2005; [212 \(2-3\)](#):165-174.

26. Feron V.J, Groten J.P, Jonker D, Cassee F.R, Van Bladeren P.J Chapter 14: Toxicology of Chemical Mixtures In: General and Appl. Toxicology. Toxicology and Air Pollution: Risk Assessment. Univer of Bourgogne; 1998.p.42-45.
27. Rodeiro I, Gámez R, Acosta P.C, Fernández S.I, Más R, Alemán C. Estudio de la genotoxicidad del D-002, un producto con actividad antiulcerosa. Revista Española de Toxicología 1998; 15 (2): 117-121.
28. Manson J.M, Smith C.C. Influence of cyclophosphamide and 4-ketocyclophosphamide on mouse limb development. Teratol 1997; 15 (3):291-293.
29. Collen G. The collaborative Study Group for the Micronucleus Test: Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of 5th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. Mut. Res 1991; 278:83-84.
30. Aujoulat M, Forichon A, Descotes J. Is a positive control useful in the rat in vivo micronucleus test? A comparative study of different routes of administration of cyclophosphamide. ICT VIII, Paris, France; 1998.p.34-36.
31. Piña B, Solís M.J, Quintanilla B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. [Toxicology and Applied Pharmacology](#) 2005; [202 \(2\)](#):189-198.
32. Aubele M, Jütting U, Rodenacker K, Gais P, Burger G, Hacker-Klom U. Quantitative evaluation of radiation induced changes in sperm morphology and chromatin distribution. [Cytometry Part A](#) 2005; [11\(5\)](#):586-594.
33. Johnson J. Administration backs chemical testing, Genetic Toxicology in germinal cells. Chem Eng News 1998; 76: 7-8.

Recibido 21/08/09

Aceptado 07/08/09