

## Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola<sup>1\*</sup>, Luis Alfredo Rosario Fernández<sup>2\*\*</sup>,

Yanet Rodríguez<sup>3\*\*</sup>, Yulieé López Feria<sup>4\*</sup>, Daiyana Díaz Rivero<sup>5\*</sup>.

<sup>1</sup> Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

<sup>2</sup> Licenciado en Microbiología

<sup>3</sup> Técnico Medio en Farmacia Industrial

<sup>4</sup> Doctor en Medicina Veterinaria

<sup>5</sup> Técnico Medio en Veterinaria.

\* Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

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

**Correspondencia a:** Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

**Teléfono:** 2716911.

**Email:** [darencibia@finlay.edu.cu](mailto:darencibia@finlay.edu.cu)

## Resumen

El ensayo citogenético *in vivo* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, pueden variar según la especie y el tejido, generalmente se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento. En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos, por estar más vascularizada y por contener una población de células de ciclo corto que pueden aislarse y tratarse con facilidad. En este artículo se reporta la frecuencia basal de aparición de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo. Se pudo concluir que los ratones NMRI y Balb-C, constituyen un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de aberraciones de tipo estructural, el índice mitótico y el número de células con poliploidía, así como se destacó la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal a las 48 y 24 horas antes del sacrificio.

**Palabras clave:** Espontánea, inducida, aberraciones cromosómicas, ratones NMRI, ratones Balb-C, ciclofosfamida, médula ósea.

## Abstract

### ***Spontaneous and induced frequency of chromosomal aberration in bone marrow of NMRI and Balb-C mice of both sexes.***

The *in vivo* cytogenetic assay is a short term mutagenicity assay, of great sensibility, useful to detect structural chromosomal aberrations fundamentally under conditions that they involve the answer the *in vivo* response, they can vary according to the species and the tissue, they are generally evaluated during the first serial mitosis to the treatment. In this method, are used cells of bone marrow of mammals to be more vascularised and to contain a cells population of short cycle that they can be isolated and to easiness. In this article is reported the basal frequency of appearance of chromosomal aberrations in of the bone marrow cells of NMRI and Balb-C mice of both sexes, as well as the induced frequency of events, after the cyclophosphamide (CF) administration for intraperitoneal route, reference mutagen used as positive control. You could conclude that the NMRI and Balb-C mice, constitute a good model to use in the genotoxicologic studies, given the spontaneous drop frequency of structural type of aberrations, the mitotic index and the number of polyploidy cells, as well as we stood out the sensibility to the cyclophosphamide action of the administered in dose of 50 mg/kg for intraperitoneal route at the 48 and 24 hours before the sacrifice.

**Key words:** Spontaneous, induced, chromosomal aberration, NMRI mice, Balb-C mice, cyclophosphamide, bone marrow.

## Introducción

El ensayo citogenético *in vivo* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, y que pueden variar según la especie y el tejido, generalmente se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento.<sup>1, 2</sup>

Con los mutágenos químicos, la mayor parte de las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico. En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. El tejido diana es la médula ósea por estar más vascularizado y por contener una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad. En el presente método no se consideran otras especies ni otros tejidos diana.<sup>3</sup>

Antes de sacrificarlos, se trata a los animales por medio de sustancias como la colchicina, que actúan como inhibidores del huso, con el fin de acumular las células en una fase de mitosis del tipo metafásico (c-metafase). A partir de las células se efectúan preparaciones de cromosomas secadas al aire y, después, teñidas; a continuación se analizan las metafases en el microscopio para observar las aberraciones cromosómicas.<sup>4</sup>

Se utilizan roedores tales como la rata, el ratón o el hámster chino. Se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos, y se reparten en grupos tratados y grupos controles negativos y positivos. Como control positivo se utiliza una sustancia que produzca aberraciones cromosómicas *in vivo*, incluyendo igualmente en el plan de cada ensayo un grupo control negativo (disolvente) o no tratado.<sup>5</sup>

En los controles positivos deberían producirse aberraciones estructurales *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Para el ensayo de base se utiliza una dosis de la sustancia de ensayo que debe ser la dosis máxima tolerada o la que haga aparecer algunos signos de citotoxicidad como, por ejemplo, una inhibición parcial de la mitosis.

Para los compuestos no tóxicos, la dosis máxima (límite) que debe investigarse tras una administración única es de 2 000 mg/kg de peso corporal.<sup>6</sup>

Si se utiliza un protocolo de dosis repetidas, la dosis límite es de 1 000 mg/kg de peso corporal. Pueden utilizarse otras dosis suplementarias cuando razones de orden científico así lo exijan. Si el ensayo se va a utilizar como método de verificación, es conveniente utilizar al menos dos dosis suplementarias.<sup>7</sup>

En este artículo se reporta la frecuencia basal de aparición de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.

## **Materiales y Métodos**

- **Animales.** Se utilizaron ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , la humedad entre  $60 \pm 10 \%$  y los ciclos de luz- oscuridad fueron de 12 horas. El alimento que se les administró a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*.

- **Grupos experimentales incluidos.**

En todos los grupos experimentales, las sustancias se administraron, 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 (5 ratones/grupo/sexo), quedando los grupos constituidos por 10 ratones /grupo en cada una de las tres series realizadas para un total de 30 ratones/grupo, 15 hembras y 15 machos en las dos líneas evaluadas.

<sup>1</sup>En 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 14 días.

<sup>2</sup>En 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, <sup>8-10</sup> administrado por vía oral durante un periodo de 14 días, el cual concuerda con el período de administración de productos a evaluar en dosis repetidas de hasta 2 000 mg/kg donde se utiliza este disolvente para realizar las emulsiones, el mismo fue preparado 2 horas antes de la administración.

<sup>3</sup>En el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9 %, ya que esta demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar, <sup>11, 12</sup> administrado por vía oral durante un periodo de 14 días, preparado 2 horas antes de la administración.

<sup>4</sup>En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF a una dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal, Ciclofosfamida: n,n-bis-(-cloruro de etilo)-n´, o-esterdiamida del ácido fosfórico propinel (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P) fue adquirida a la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %.<sup>13</sup> La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada dos veces a los animales (48 y 24 horas antes del sacrificio programado).<sup>14</sup> (Ver Tabla 1)

- **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 horas después de la última administración pasados los 14 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, el sacrificio se realizó 24 horas después de administrada la CF por segunda vez, para que de esta

forma las aberraciones analizadas fuesen las que estuvieron expuestas al mutágeno,<sup>15</sup> haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.

**- Exámenes realizados.**

**Ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo*:** En el horario de la mañana (4 horas antes del sacrificio), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (4 mg/kg, vía i.p). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCL (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 minutos. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 30-35 min. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos.<sup>16</sup> También se calculó el índice mitótico (IM%) (porcentaje de metafases en 1 000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles, todas las determinaciones fueron leídas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.

Análisis estadístico: Las variables continuas se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y las categóricas mediante la prueba de homogeneidad ( $\chi^2$ ). El nivel de significación establecido fue  $\alpha = 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (Data Analysis Software System), versión 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

## 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 durante los 14 días de administración, así como los tratados con el control positivo CF tampoco se encontraron animales con signos y síntomas de toxicidad evidente, por tanto la dosis de CF empleada en este ensayo 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.<sup>7,13,17-19</sup>

El tratamiento con Tween 65 al 2 % y NaCl al 0,9 % durante 14 días en ratones NMRI y Balb-C no indujo incremento del número de células con aberraciones en ninguno de los sexos, al ser comparado con sus respectivos controles, tal como se puede apreciar en la Tabla 1, por tanto el tratamiento con estas sustancias bajo nuestras condiciones no induce aberraciones cromosómicas en estos ratones, una vez que las aberraciones estructurales y numéricas fue comparable en los grupos tratados con relación al control negativo, en todos los casos el comportamiento observado se encuentra dentro del rango reportado para esta especie encontrándose de 0 al 3% de células con aberraciones.<sup>20</sup>

Por su parte, los grupos tratado con CF en ambos sexos, en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal, evidenciaron un incremento significativo del número de células metafásicas con aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, siendo esto consistente con lo planteado por diferentes autores.<sup>21,22</sup> La CF mostró un incremento en el promedio de aberraciones estructurales tales como gaps, intercambio cromosómico, ruptura e intercambio cromatídico y a su vez aumento el porcentaje de células con aberraciones, con relación al grupo control negativo y con los grupos sustancia vehículo 1 y 2, de igual forma se observó una disminución del índice mitótico aparejado a un incremento del número de células con poliploidía, este aumento en el grupo tratado con CF evidencia la acción mutagénica y citotóxica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada, lo cual concuerda con resultados obtenidos en estudios *in vivo*, *in vitro* en roedores<sup>15</sup> e *in vitro* en humanos.<sup>23</sup>

De igual modo, las sustancias vehículos 1 y 2 tampoco indujeron citotoxicidad en ninguno de los sexos, tanto en hembras como en machos el índice mitótico fue similar al encontrado en el grupo control no tratado, lo que indica que el tratamiento de esta sustancias en ninguno de los sexos inhibió la progresión del ciclo celular a la dosis y tiempo de administración empleado, resultado diferente al observado en los animales tratados con CF, donde se manifestó una ligera pero significativa disminución del índice mitótico, tal como se reporta para este mutágeno en animales y en humanos.<sup>24</sup> El mayor efecto de la acción

mutagénica de la CF se manifiesta en el incremento de las aberraciones estructurales, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Richold en 1990 y Tice en 1994 los cuales llegaron a la conclusión de que dicho ensayo es más sensible para detectar aberraciones estructurales.<sup>3,4,25</sup> Los resultados observados en los grupos tratados con CF en el presente estudio validan la sensibilidad del diseño experimental empleado.

Dada la n tan grande utilizada en nuestro ensayo, así como la evaluación de todos los resultados por dos observadores experimentados en el tema nos permite afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales el número de células con aberraciones espontáneas en la línea NMRI se encuentra en el rango de 9-14 células en 1 000 células leíbles por grupo como promedio, en el caso de la línea Balb-C se encuentra entre 7-10 células en 1 000 células leíbles por grupo como promedio, lo cual nos permite afirmar a su vez que la línea Balb-C es más eficiente para su uso en este ensayo que la NMRI, ya que presenta un índice menor, lo cual permite tener mayor seguridad a la hora de evaluar nuestros productos.

En cuanto a la CF el número de células con aberraciones en la línea NMRI se encontró en el rango de 219-223 células en 1 000 células leíbles por grupo como promedio, en cuanto a la línea Balb-C el rango encontrado estuvo entre 175-192 células en 1 000 células leíbles por grupo como promedio, lo cual nos permitió afirmar que bajos nuestras condiciones experimentales en la línea NMRI la CF indujo un incremento mayor de células con aberraciones que en la Balb-C, lo cual concuerda y se encuentra en conjunción con lo hallado por nosotros en el grupo control y sustancia vehículo 1 y 2, ya que al tener esta línea un mayor índice espontáneo de aberraciones y al estar expuesta a las dosis tóxicas y clastogénicas de la CF, de forma biológica y normal debe aumentar este valor, es decir el número de células con aberraciones debe ser mayor al tratarse con el mutágeno, lo cual a su vez nos permitió afirmar que la línea NMRI es más susceptible a la acción de la CF que la Balb-C.

En cuanto al número de células con poliploidía se pudo apreciar que en la línea NMRI este indicador se encuentra en el rango de 0-2 células con poliploidía en 1 000 células leíbles como promedio y en la línea Balb-C se encuentra en el rango de 0-1 células con poliploidía en 1 000 células leíbles como promedio pero sin diferencias significativas entre ellos, en el caso de los grupos tratados con CF en la línea NMRI el número de células con poliploidía se

encuentra en el rango de 15-20 en 1 000 células leíbles como promedio y en el caso de la línea Balb-C el rango esta entre 14-18 células con poliploidía en 1 000 células leíbles como promedio. (Ver Tabla 2)

## **Conclusiones**

Se pudo concluir que la línea de ratón NMRI y Balb-C, constituyen 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 aberraciones de tipo estructural, el índice mitótico y el número de células con poliploidía, así como se destacó la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal a las 48 y 24 horas antes del sacrificio.

**Tabla 1. Grupos experimentales en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* para las tres series, vía gástrica.**

Grupos Experimentales	# de animales	Sustancia a administrar	Vía de administración	Volumen máximo a administrar ml/kg
<sup>1</sup> Control negativo (NMRI)	30	No tratado	Oral (Simulacro)	-
<sup>2</sup> Sustancia vehículo 1 (NMRI)	30	(Tween 65, al 2 %)	Oral	2
<sup>3</sup> Sustancia vehículo 2 (NMRI)	30	(NaCl 0,9 %)	Oral	2
<sup>4</sup> Control positivo (NMRI)	30	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15
<sup>1</sup> Control negativo (Balb-C)	30	No tratado	Oral (Simulacro)	-
<sup>2</sup> Sustancia vehículo 1 (Balb-C)	30	(Tween 65, al 2 %)	Oral	2
<sup>3</sup> Sustancia vehículo 2 (Balb-C)	30	(NaCl 0,9 %)	Oral	2
<sup>4</sup> Control positivo (Balb-C)	30	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15

**Tabla 2. Resultados del promedio en las tres series experimentales, de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos.**

Grupos	IM (%) <sup>a</sup>	Células con Poliploidía <sup>b</sup>	Gap s <sup>b</sup>	Aberraciones/1 000 células/grupo/serie <sup>b</sup>				# de Células con aberraciones <sup>b</sup>
				Cromosómicas		Cromatídicas		
				Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
<b>Ratones NMRI</b>								
<b>Machos</b>								
Control Negativo	5,42 ± 0,43	1	4	0	0	8	1	9
CF 50mg/kg	3,52 ± 0,21*	15**	45* *	10**	25**	169**	19**	223**
Sustancia vehículo 1	5,33 ± 0,50	0	6	0	0	6	1	7
Sustancia vehículo 2	5,10 ± 0,32	0	3	0	0	10	1	11
<b>Hembras</b>								
Control Negativo	5,12 ± 0,23	1	8	0	0	10	2	12
CF 50mg/kg	3,68 ± 0,12*	20**	51* *	6**	32**	155**	26**	219**
Sustancia vehículo 1	5,21 ± 0,55	2	2	0	0	13	1	14
Sustancia vehículo 2	5,03 ± 0,48	1	5	0	0	7	3	10
<b>Ratones Balb-C</b>								
<b>Machos</b>								
Control Negativo	5,65 ± 0,56	1	4	0	0	4	3	7
CF 50mg/kg	3,89 ± 0,24*	14**	47* *	6**	18**	133**	18**	175**
Sustancia vehículo 1	5,49 ± 0,53	0	6	0	0	6	2	8
Sustancia vehículo 2	5,86 ± 0,20	0	7	0	0	7	3	10
<b>Hembras</b>								
Control Negativo	5,98 ± 0,22	1	6	0	0	8	0	8
CF 50mg/kg	3,93 ± 0,84*	18**	44* *	4**	19**	142**	27**	192**
Sustancia vehículo 1	4,98 ± 0,79	0	5	0	0	7	1	8
Sustancia vehículo 2	5,12 ± 0,63	1	2	0	0	9	0	9

<sup>a</sup> X ± D.E. De un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 30 000 células evaluadas, \*p<0.05; ANOVA.

<sup>b</sup> \*\*p<0.01; prueba no paramétrica  $\chi^2$ .

Comparación contra el control negativo, CF= Ciclofosfamida.

---

## Referencias Bibliográficas

1. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 1999; 189:157-165.
2. Sorsa M, Ojajarvi A, Salomaa S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals Teratogen, Carcinogen, and Mutagen 1999; 10:215-221.
3. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse D.G, Bootman J. *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity Tests. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney; 1990.p.115-141.
4. Tice R.R, Hayashi M, MacGregor J.T, Anderson D, Blakey D.H. Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res* 1994; 312:305-312.
5. Fielder R.J, Alleen J.A, Boobis A.R, Botham P.A, Doe J. Report of British Toxicology Society/ UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis* 1992; 7:313-319.
6. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Modificación de los Anexos I, IV, V, VI y IX del R.D. Orden de 5 de Abril de 2001. REAL DECRETO 363/1995. Reglamento sobre Notificación de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas. BOE núm. 94. Madrid, España; 2001.p.12-13.
7. Arencibia D.F, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, Goicochea E. Efectos del D-003, mezcla de Ácidos Alifáticos en el ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vivo*. *Revista Cubana de Farmacia* 2010; 44(2):23-24, en prensa.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. Arencibia D.F, 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.
14. Carrano A. Chromosomal alterations as markers of exposure and effect. *J. Occup. Med* 1999; 28:1112-1116.
15. Perry C.S. Differential toxicities of cyclophosphamide and its Glutathione metabolites to A549 cells. *Toxic. In vitro* 1995; 9(1):21-26.
16. OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OCDE TG 475 (Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells). Anexo B11; 1997.p.5-6.
17. 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.
18. 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), en prensa.

19. Arencibia DF, Rosario L.A, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. Retel (Revista de Toxicología en Línea) 2009; 20(1):2-14.
20. Kramer P.J. Genetic toxicology. The *in vitro* and *in vivo* aberration test. J-Pharm-Pharmacol 2000; 4:395-405.
21. Crane C, Zamora H, Bermúdez A, Barreto H, Pardo C, Ahumada J. Análisis de aberraciones cromosómicas para dosimetría genética. Acta Med Biol Colomb 1999; 19:330-339.
22. Hoyos L, Carvajal S, Solano L, Rodríguez J, Orozco L, López Y. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. Environ Health Persp 1996; 104:535-538.
23. Preston R, San S, Mcfee A. The *in vitro* and *in vivo* human lymphocyte assays for assessing the clastogenicity of chemical agents. Mutat Res 1987; 143:170-183.
24. Paz-y-Miño C, Bustamante G, Sánchez M, Leone P. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. Environ Health Perspect 2002; 110:1077-1080.
25. Ecobichon D.J. Mutagenesis, the basis of toxicity testing. Mc Gill University, Montreal. De. CRC, INC, Boca Ratón, Florida; 2001.p.113-136.

**Recibido: 12/10/09**

**Aceptado: 14/10/09**