

Estrategias en las evaluaciones genotóxicas.

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

Janet Morffi Figueroa^{3***}, Dayisell Lazara Curveco Sánchez^{4****}.

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Licenciado en Microbiología, MsC

⁴Técnico Medio en Farmacia.

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

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

***Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), calle 222 e/ 23 y 25, La Coronela, Municipio Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

****Centro de Productos Naturales (CPN), 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

Los estudios sobre mutagénesis y genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia en el ámbito mundial por el constante deterioro al que está sujeto el hábitat del hombre moderno. Existen dos razones principales que justifican la preocupación del hombre frente a la exposición a los agentes mutagénicos. Primero, un incremento en el grado de mutación de las células germinales puede provocar el aumento de la incidencia de enfermedades genéticas en las futuras generaciones. Segundo, las mutaciones en las células somáticas pueden contribuir a varios desórdenes e incluso, estar involucradas en la patogénesis de algunas enfermedades degenerativas crónicas. El objetivo fundamental de la mayoría de las autoridades regulatorias es que en la evaluación farmacotóxica de los productos se cumplan todos los requisitos establecidos. El objetivo de este trabajo es brindar una estrategia actualizada sobre la realización de las evaluaciones genotóxicas de productos, medicamentos y nuevos ingredientes activos. Tuvimos en cuenta los estudios mutagénicos y genotóxicos *in vitro* y dentro de estos el ensayo de Ames y el ensayo de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana. En cuanto a los estudios genotóxicos *in vivo* tratamos el tema del ensayo cometa en leucocitos de sangre periférica de ratones, el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón y por último el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Palabras claves: Genotoxicidad, toxicología genética, evaluaciones genotóxicas, batería de ensayos genotóxicos, estrategias.

Abstract

Strategies in the genotoxic evaluation.

The mutagenesis and genotoxicity studies have than enough more acquire every day bigger importance in the world environment for the constant deterioration to which is subject the modern man's cohabite. Two main reasons that justify the man's concern in front of the exhibition to the mutagenic agents exist. First, an increment in the degree of mutation of the germinal cells can cause the increase of the genetic illnesses incidence in the future generations. Second, the mutations in the somatic cells can contribute to several disorders and even, to be involved in the pathogenesis of some chronic degenerative illnesses. That in the pharmacotoxic evaluation of the products all the established requirements are completed it is the fundamental objective of most regulatory authorities. The aim of this work is to offer a modernized strategy on the realization of the products genotoxic evaluations, medications and new active ingredients. We kept in mind the mutagenic and *in vitro* genotoxic studies and inside these the Ames assay and the chromosomal aberrations assay in human lymphocytes culture of peripheral blood. As for the *in vivo* genotoxic studies we treat the topic of the comet assay in leukocytes of mice peripheral blood, the micronuclei assay in bone marrow erythrocytes of mice and lastly the sperm head morphology assay.

Key words: Genotoxicity, genetic toxicology, genotoxic evaluations, battery of genotoxic assays, strategies.

Introducción

La genética toxicológica tiene sus inicios en el año 1927, cuando Mueller demuestra la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila melanogaster*. Años más tarde, en 1949, Auebach descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, descubrimiento que permitió incrementar el concepto de mutagénesis.

Durante las décadas del 50 y 60 se alcanzan la mayor parte de los conocimientos básicos acerca de la estructura y replicación del ADN, código genético, los mecanismos de la síntesis proteica y la reparación del ADN. No en vano, esta época se describe como la edad de oro de la Genética Molecular.

La sociedad de Mutagénesis Ambiental es fundada en 1969, debido a la preocupación de muchos investigadores por el impacto genético que podría acarrear la proliferación de contaminantes químicos en el ambiente, producto de la actividad humana. Es en este mismo año que es reconocida la Toxicología Genética, como disciplina científica.

Décadas más tarde, el desarrollo de la denominada tecnología del ADN recombinante ofreció metodologías que han resultado fundamentales en el conocimiento directo de la estructura y configuración del genoma, la identificación de genes específicos, la determinación de las alteraciones generadas en la información genética y su relación con la inducción del cáncer y otras enfermedades de base genética.¹

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.^{2,3} 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.^{4, 5}

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.^{5, 6}

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.⁵ 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 eucariota, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante.⁷

El objetivo de este trabajo es brindar una estrategia actualizada sobre la realización de las evaluaciones genotóxicas de productos, medicamentos y nuevos ingredientes activos.

Desarrollo

Estrategias:

Por lo general los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías, la que se propone para su uso en humanos y otra que por lo general es la vía intraperitoneal, las autoridades regulatorias tales como la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) y EPA (Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos), exigen un ensayo *in vitro* que determine daño a nivel de genes, de elección el ensayo de Ames, y un ensayo *in vivo* que determine daño a nivel de los cromosomas, de elección el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones para realizar la solicitud de ensayo clínico

fase I, en voluntarios sanos. Pero en los productos que se van a administrar por largos periodos de tiempo en el humano sea de forma preventiva o profiláctica, se deben realizar estudios de carcinogénesis y al estar estrechamente relacionados estos dos tipos de evaluaciones, ya que por lo general la mayoría de las sustancias que son genotóxicas constituyen una fuente importante de sustancias cancerígenas, es necesario que se determine y evalúe el daño en todos los niveles. Para lo cual existen en nuestros días una gama de ensayos genotóxicos para que se utilice de forma estratégica y sensata los más convenientes según las propiedades del producto a evaluar y las condiciones de equipamiento las cuales incluye (personal calificado, materiales, medios, disponibilidad de equipamiento, experiencia en la técnica evaluativa y en la interpretación científica), para de esta forma poder darle una explicación real y veraz a los resultados obtenidos. En la figura número 1 se encuentran los ensayos más utilizados y el nivel de daño que determinan, en rojo se encuentran los más reportados dentro de cada segmento o grupo. Dado que la mayoría de estos ensayos son bastante caros es conveniente que se elija cual realizar y nunca se realice estudios que determinen el mismo daño, pues se consideran repetitivos. (Ver Figura 1)

Estudios mutagénicos y genotóxicos in vitro.

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. La adecuada determinación de las actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos.⁵ El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente.⁸

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos es de carácter obligatorio a nivel internacional.⁹ La diversidad de efectos deletéreos a los que está

expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo. El amplio espectro de mutaciones que pueden originarse no sería abarcado en un ensayo aislado y ofrecería un resultado poco preciso. Resulta imprescindible usar un grupo de ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico de la sustancia de interés para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una correcta extrapolación de los hallazgos detectados, al hombre.

- Ensayo de Ames.

Este ensayo permite definir un daño existente o no a nivel de genes. Dentro de estos estudios se encuentra el ensayo de Ames, método en el cual se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye al ensayo la fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema. Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina.⁷ Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (his-), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Después de 66 horas de incubación a 37°C, las colonias revertantes son contadas. El valor igual o mayores dados, de la expresión obtenida de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de las placas control, indica la presencia de actividad mutagénica en la muestra problema, pero se plantea que para que existan diferencias significativas en las placa tratadas con el producto a evaluar al menos deben haber revertido el doble de las colonias revertantes en la muestra control.¹⁰

Este ensayo propuesto por Ames en 1973,¹¹ el cual es el más empleado para el tamizaje genotoxicológico de nuevas sustancias propuestas como medicamentos, por su alta predictibilidad en la detección de carcinógenos genotóxicos que inducen mutaciones puntuales.

La metodología de incorporación en placas en presencia y ausencia de fracción microsomal hepática S9, es el protocolo estándar que se utiliza comúnmente para realizar la prueba.¹²⁻¹⁴

- Ensayo de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana.

Otro estudio a destacar lo constituye la determinación de aberraciones cromosómica *in vitro* en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana. Este ensayo tiene por objetivo detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo,¹⁵ por ende determina daño a nivel de cromosomas. Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. No obstante, el presente método no está pensado para medir aberraciones de ese tipo ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la inducción de cánceres en los seres humanos y los animales de experimentación.¹⁶

En este ensayo pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas, estirpes celulares o cultivos de células primarias. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad cariotípica, el número y la diversidad cromosómica y la frecuencia de las aberraciones cromosómicas espontáneas.

En los ensayos «*in vitro*» suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca sino que se deban a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad.¹⁷

Este ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, éstos actúan por mecanismos distintos de la lesión directa del ADN.¹⁸

Por lo general se realizan dos cultivos por muestra a evaluar y en ambos tipos de diseños en el tratamiento agudo y en el crónico debe utilizar como mínimo 5 grupos divididos en un grupo control, 3 niveles de dosis de la sustancia a evaluar donde mientras mayor sea la dosis a la que exponga los cultivos mejor será y un grupo control positivo, el cual estará en dependencia de cada diseño si es un pro-mutágeno o un mutágeno en si.

Estudios genotóxicos in vivo.

Aún los ensayos *in vivo* siguen siendo de gran utilidad y hasta el momento no se han podido cambiar por otros llamados en la actualidad como métodos alternativos en la toxicología experimental, no obstante se deben destacar el avance de técnicas que cada día van encaminadas a realizar un uso racional de los animales en nuestra investigaciones, dentro de estas se destacan el principio de las "3R", llamadas refinamiento, reducción y "reemplazo". Dentro de los ensayos *in vivo* más utilizados se encuentra el ensayo cometa en ratón, el cual permite definir si una sustancia dada es capaz de alterar la estructura primaria en el ADN, ensayo que aún no ha sido validado pero muy usado en este campo como primario y pivote. Otro ensayo *in vivo* y quizás el más clásico lo constituye el de micronúcleos en médula ósea donde se determina el daño a nivel de cromosomas y por último el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, hasta el momento las agencias reguladoras exigen que se debe realizar en dos especies el cual mide el daño a nivel celular.

- Ensayo cometa en leucocitos de sangre periférica de ratones.

Este ensayo permite detectar un daño existente o no en la estructura primaria del ADN, tanto en la variante *in vivo* como en la *in vitro*. Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostrados sus implicaciones en enfermedades degenerativas y el cáncer.¹⁹ En 1988 Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para la detección de este tipo de daño proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual siendo más rápido, sensible y económico,²⁰ con respecto a otros estudios genotoxicológicos como, intercambio de cromáticas hermanas, elusión alcalina y el ensayo de micronúcleos.²¹

El ensayo cometa *in vivo* consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras. A pH>13 los sitios lábiles al álcalis (SLA) como los sitios apurínicos son rápidamente transformados a rupturas de simple cadena. El uso de este pH permite maximizar la expresión de los SLA a rupturas de simple cadena.²² Seguidamente al someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, proceso durante el cual los fragmentos negativamente cargados de ADN (ADN dañado) o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo,²⁰ apreciándose una estructura parecida a la de un cometa,²³ al teñir el ADN luego de la electroforesis. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN siendo los rompimientos de doble cadena los causantes de mayor frecuencia de migración del material genético.²² Por otra parte las células controles tienen un bajo número de roturas, estas exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN. En dichas células el ADN tiene cierta migración,²⁴ encontrándose un 10% de este en la cola.²²

Para detectar y cuantificar el daño al ADN este puede ser teñido con diferentes agentes como el nitrato de plata siendo mas frecuentemente usados los agentes fluorescentes. La elección de uno u otro depende de las necesidades específicas de cada investigador.²⁴

Se utilizan 5 animales/sexo/grupo, a los cuales se administra durante un periodo de 14 días consecutivos si la dosis máxima a evaluar de su producto es de 1 000 mg/kg, es decir se evalúa en dosis repetidas, de evaluarse la dosis máxima 2 000 mg/kg se puede administrar una sola dosis. Se forman 4 grupos 1 control solvente y 3 niveles de dosis del producto en cuestión y se plantea que en el caso de cometa *in vivo* puede o no incluir un grupo control positivo, el cual puede administrarle al animal en dosis y vía diferentes a los demás grupos.

- Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratones.

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo. Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.²⁵

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.²⁶

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero

o de ADN centromerito en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados.²⁷

Si los animales se tratan de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede emplearse como parámetro en el ensayo el número de eritrocitos maduros (normocromáticos) con micronúcleos en la sangre periférica respecto a un número determinado de eritrocitos maduros.²⁸

Este ensayo está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*. Por lo general si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o su metabolito activo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.²⁹

- Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón y rata.

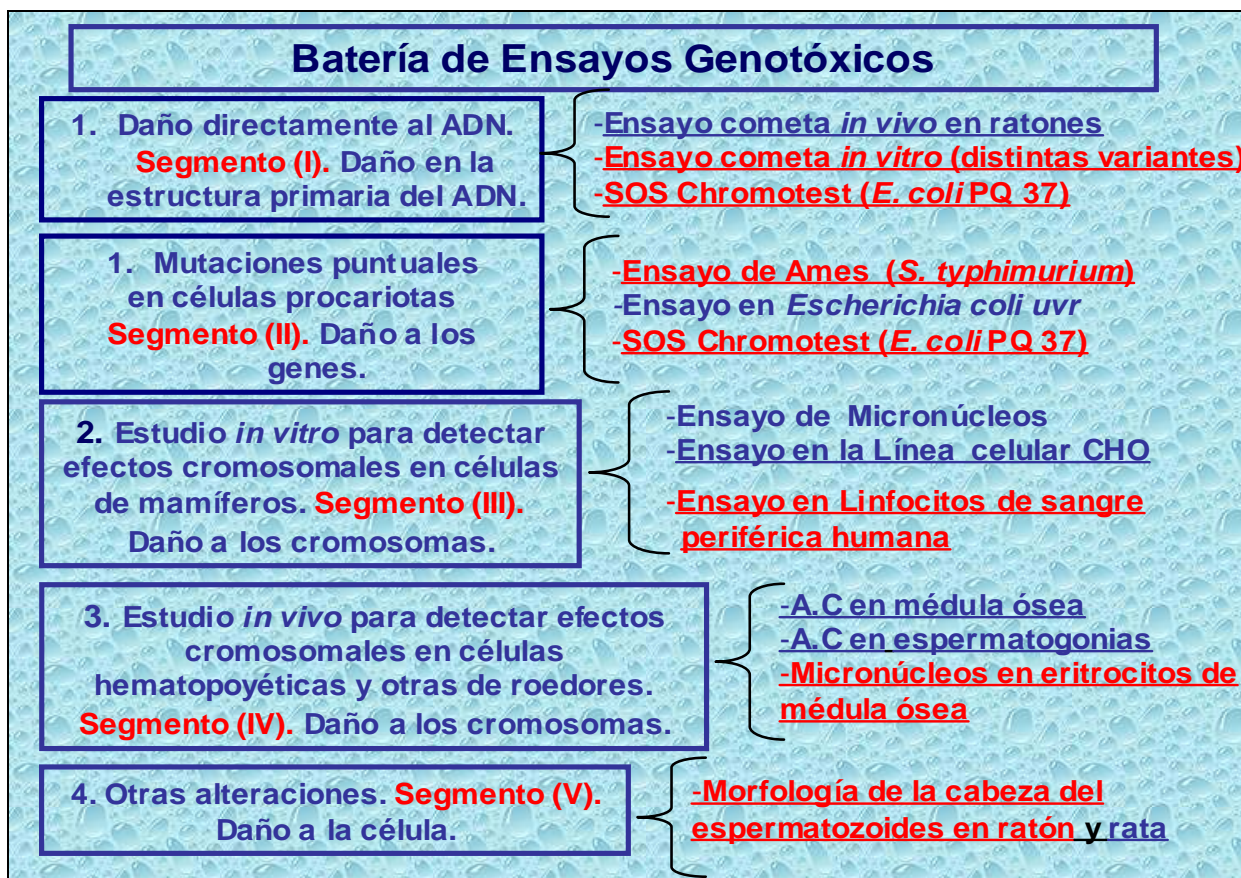
Por otro lado el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas el cual en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por periodos 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.³⁰

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.³¹ 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, 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.³² 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.³³ Se puede realizar lo mismo en ratones que en ratas, tanto en una especie como en la otra la sustancia a evaluar debe ser administrada a los animales por un ciclo espermático completo que en el ratón corresponde a un tiempo de 35 días³⁴ y en la rata de 52 días.³¹

Por lo general las regulaciones exigen que se formen 5 grupos experimentales, y que se administren de 8-10 animales por grupo. Se formará un grupo control negativo, 3 niveles de dosis del producto a evaluar y 1 control positivo utilizándose sustancias de referencias reconocidas internacionalmente, de las cuales se conozca su mecanismo de acción y que en algún momento en su ruta metabólica lleguen a las células germinales, una de estas sustancias y quizás la mas utilizada para este fin es la ciclofosfamida, además de otras tales como la bleomicina y la mitomicina C.³⁵

Figura 1. Batería de ensayos genotóxicos.



Referencias Bibliográficas

1. Rossner P, Binková B, Radim J. The influence of occupational exposure to PHAs on the blood plasma levels of levels of p53 and p21waf1 proteins. *Mutat. Res* 2003; 535(4):87-94.
2. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar J.N, Poddar G. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 34(3):133-143.
3. 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. *Environ and Molec Mutagen* 2003; 41(3):85-91.
4. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ and Molec Mutagen* 2002; 39(2):119-126.
5. Mortelmans K, Rupa D. Current Issues in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56(3):379-397.
6. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiol* 2000; 134(2):756-760.
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: X Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental; 2000.p.108-109.
8. Felton J.S, Knise M, Salmon C.P, Malfatti M.A, Kulp K.S. Human exposure to heterocyclic amine food mutagens / carcinogens: Relevance to breast cancer. *Environ and Molec. Mutagen* 2002; 39(2):112-118.
9. Curbelo A, Remigio A.C, Pérez G, Fernández N, Rivero Y. Evaluación genotóxica in vivo de dos insecticidas biológicos con el ensayo de micronúcleos. En: 4to Taller Nacional y 2do Taller Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. Ed: CNIC; 2001.p.28-30.

10. Hazen M. Las células vegetales como sistema de ensayo para la evaluación de compuestos fotoactivos. Evaluación mutagénica y genotóxica. Ed: Sociedad Española mutagénesis Ambiental; 2000.p.80-81.
11. Ames B.N, Durston W.E, Yamasaki E, Lee F.D. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.nat.Acad.Sci 1973; 70(2):281-285.
12. Rodeiro I, Gámez R, Acosta P, Fernández I, Más R, Alemán C. Estudio de la genotoxicidad del D-002, un producto con actividad antiulcerosa. Rev. Española de Toxicología 1998; 15(3):117-121.
13. Gámez R, Rodeiro I, Fernández I, Acosta P.C. A preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: a mixture of very long chain fatty acids. Terato Carcino Muta 2001; 22(3):175-181.
14. Maron D.M, Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 1983; 113(3):173-174.
15. Huang Y, Change C, Trosko J.E. Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res 2000; 43(2):1362-1364.
16. Elliot B.M, Combes R.D, Elcombe C.R, Gatehouse D.G. Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in «In Vitro» Genotoxicity Assays. Mutagenesis 1999; 10(3):175-177.
17. Galloway S.M, Aardema M.J, Ishidate M. Report from Working Group on in «In Vitro» Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res 1994; 312(2):241-261.
18. Soper K.A, Galloway S.M. Replicate Flasks are not Necessary for «In Vitro» Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res 2000; 320(2):139-149.
19. Singh N.P, McCoy M.T, Tice R.R, Schneider E.L. A simple technique for quantification of low levels of ADN damage in individual cells. Exp. Cell Res 1988; 175(1):184-191.
20. Collins A.R. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. Mol. Biotech 2004; 26(2):249-261.
21. Flee R, Steinert S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in acuatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res 2003; 544(3):43-64.

22. Tice R.R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35(1):206-221.
23. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 2003; 18(2):159-166.
24. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1):45-51.
25. Hayashi M, Tice R.R, MacGregor J.T, Anderson D. In Vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res* 1994; 312(2):293-304.
26. Higashikuni N, Sutou S. An optimal, generalised sampling time of 30 ±6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis* 1995; 10(1):313-319.
27. Gollapudi B, McFadden L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res* 2000; 354(2):97-99.
28. Arencibia D.F, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la (*Roystonea regia*), mediante el ensayo de micronúcleos. *Rev. Cubana de Farmacia* 2009; 43(2):8-9.
29. Gámez R, Fernández I, Acosta P.C, Alemán C, Rodeiro G, Rodríguez M. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev. CENIC* 2000; 31(3):211-216.
30. Arencibia D.F, 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.
31. Arencibia D.F, 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.

32. Wyrobek A.J. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.
33. 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.
34. Arencibia D.F, 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.
35. Adler I.D, Shelby M.D, Bootman J. International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res* 1994; 312:313-318.

Recibido: 14/10/09

Aceptado: 15/10/09