

Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad.

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.

Centro de Trabajo:

* 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

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 las 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. Este trabajo tiene por objetivo determinar una metodología que permita evaluar bajo repetitividad la frecuencia de aparición de formas anómalas de la cabeza del espermatozoide, la frecuencia de aparición de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos y la evaluación de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de roedores. Pensamos que el desarrollo de estas técnicas serán de utilidad para aquellos investigadores que se dedican a la genotoxicidad *in vivo*.

Palabras claves: Genotoxicidad, técnicas, evaluaciones genotóxicas, batería de ensayos genotóxicos.

Abstract

Development and standardization of the three genotoxicity assays technique.

Two main reasons that justify the man's concern in front of the exposure to the mutagenic agents exist. First, an increment in the degree of mutation of the germinal cells may cause the increase of the genetic illnesses incidence in the future generations. Second, mutations in the somatic cells can contribute to several disorders and even, to be involved in the pathogenesis of some chronic degenerative illnesses. The aim of this work is to determine a methodology that allows evaluating low repetitivity the appearance frequency of the anomalous forms of the sperm head, the frequency of micronucleis appearance in erythrocytes polychromatophilic and the evaluation of chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents. We think that the technical development will be useful for researchers who are dedicated to the *in vivo* genotoxicity.

Key words: Genotoxicity, technique, genotoxic evaluations, battery of genotoxic assays.

Introducción

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.¹⁻³ 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.⁶

Este trabajo tiene por objetivo determinar una metodología que permita evaluar bajo repetitividad la frecuencia de aparición de formas anómalas de la cabeza del espermatozoide, <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

la frecuencia de aparición de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos y la evaluación de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de roedores, como técnicas en la batería de ensayos de genotoxicidad. Pensamos que el desarrollo de estas técnicas serán de utilidad para aquellos investigadores que se dedican a la genotoxicidad *in vivo*.

Desarrollo

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de epidídimos:

Esta metodología es reconocida como útil dentro de las baterías de ensayo de genotoxicidad, por la información que brinda en el estudio de células germinales, como por su costo.

Procedimiento:

1. Selección de los niveles de dosis, momento del sacrificio, vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

1.1 Los criterios para la selección de las dosis se basan en los valores de la LD₅₀ encontrados. El mayor nivel de dosis debe demostrar cierta toxicidad en las células espermatogénicas. A partir de este nivel se deben incluir al menos otros dos inferiores para tratar de demostrar la existencia de un efecto relacionado con las dosis. De no haber sido determinada la LD₅₀ ni toxicidad en células germinales, las dosis a utilizar deben tener en cuenta la farmacocinética y/o las dosis farmacológicas de la sustancia ensayo, los resultados de estudios de toxicología subcrónica y crónica y la posible dosis a utilizar en humano.⁷

1.2 Se realizará como esquema fundamental 5 administraciones separadas 24 horas por la vía que resulte común a la que será utilizada en humanos. Puede incluirse además la vía intraperitoneal como aquella que no presenta factores modificadores del compuesto. Otros esquemas pueden incluir la inoculación durante 35 días en ratones e inclusive hasta 8 semanas, para realizar el seguimiento de todo el periodo de espermatogénesis y en ratas hasta 52 días.⁸

1.3 Se utilizarán al menos 4 grupos de tratamiento incluido los controles, con un mínimo de 8 animales por cada grupo.

1.4 Es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.⁹

2. Procedimiento experimental.

2.1 Después que los animales son aceptados por su adecuado estado de salud, son entonces ubicados aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales.

2.2 Al terminar el tratamiento se sacrifican los animales aleatoriamente por dislocación cervical.

2.3 Se aplica alcohol al 70 % en el abdomen, cortar con tijeras de iris la piel que cubre el abdomen y extraer los epidídimos y testículos dejándolos al descubierto.

2.4 Cortar los testículos y pesar (si el protocolo lo requiere).

2.5 Cortar los epidídimos, pesar (si el protocolo lo requiere) y colocarlos en placas petri conteniendo 1 mL de solución salina (NaCl 0.9 %). En el caso de ratas solo se procesa un epidídimo pero utilizándose solo la cabeza. Para ratones se procesan los dos.

2.6 Con ayuda de una tijera de punta fina reducir los epidídimos a pedazos muy pequeños.

2.7 Añada nuevamente solución salina (2 mL) y trasvase todo a un tubo de ensayo de 10 mL.

2.8 Homogenice por agitación mecánica manual (golpes suaves sobre las paredes del tubo).

3. Conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer.

3.1 Adicionar 10µl de tripsina 0,025 % a la solución de espermatozoides, homogenizar manualmente y dejar reposar durante 3 minutos para destruir el tejido de alrededor de los espermatozoides evitando la formación de agrupaciones de estos.¹⁰

3.2 Adicionar 2 mL de NaCl para completar 5 mL y homogenizar manualmente.

3.3 Diluir la solución anterior 1:100 en NaCl-Formol 1% homogenizar manualmente, montar la cámara de Neubauer y realizar conteo.

4 Tinción y morfología del espermatozoide.

4.1 Adicionar a la solución de NaCl - espermatozoides de 5 a 10 gotas de eosina Y 1 %, homogenizar manualmente y dejar reposar por 5 minutos.

4.2 Homogenizar manualmente y colocar una gota en cada lámina seca.

4.3 Cubrir con un cubreobjetos presionando ligeramente sobre la lámina para eliminar las burbujas que puedan quedar atrapadas.

4.4 Secar los bordes de la lámina con papel de filtro.

4.5 Codificación de las láminas siguiendo una tabla de números aleatorios. Dos láminas por animal.

4.6 El análisis de las láminas debe realizarse a ciegas, contabilizando 500 espermatozoides por lámina (según protocolo) y diferenciando entre espermatozoides con forma normal y anormal (amorfa, banana y sin gancho) pueden contabilizarse como anormal espermatozoides con dos colas (si el protocolo lo requiere). Determinándose el porciento de cada una de las formas.¹¹

5 Análisis estadístico: Se determina la normalidad de los datos de cada una de las formas en cada grupo de tratamiento, los datos serán transformados mediante la transformación que más se adecue a la normal y se realizará un análisis de varianza. Para determinar diferencias entre pares de grupos se utilizará la *t* de Student's.

En caso de que la distribución no sea normal y/o los datos transformados en ningún caso se adecuen a esta distribución, se realizará un análisis no paramétrico, Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Mann-Whitney para pares de grupos si el primer análisis resulta significativo.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores:

Esta metodología es reconocida como útil dentro de las baterías de ensayo de genotoxicidad, tanto por la información que brinda como por su costo.

Procedimiento:

1. Selección de los niveles de dosis, sexo, momento del sacrificio vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

1.1 Los criterios para la selección de las dosis se basa en los valores de la LD₅₀ encontrados. El

mayor nivel de dosis debe demostrar cierta toxicidad a la médula ósea. A partir de este nivel se deben incluir al menos otros dos inferiores para tratar de demostrar la existencia de un efecto relacionado con las dosis. Cuando no sea determinada la LD₅₀ ó estudios precedentes en este ensayo no den positividad se recomienda utilizar las dosis máximas recomendadas para este ensayo (2 000 mg/kg/día para tratamientos de hasta 14 días y 1 000 mg/kg/día para tratamientos de más de 14 días). Si hay evidencias de que la sustancia no es tóxica se puede emplear un solo nivel de dosis (la máxima).¹²

1.2 Ambos sexos pueden ser utilizados en los ensayos con el objetivo de detectar posibles diferencias sexo específicas en la respuesta al agente, no menos de cuatro animales por grupo pueden ser utilizados y analizadas 2 000 células por animal.

1.3 Se realizarán dos administraciones separadas 24 horas por la vía que resulte común a la que será utilizada en humanos. Debe incluirse además la vía intraperitoneal como aquella que no presenta factores modificadores del compuesto.¹³

1.4 Pueden ser utilizados dos tiempos de sacrificio a las 24 horas de la última administración si el tratamiento fue dosis repetidas y a las 24 y 48 horas en caso de dosis únicas, para descartar resultados negativos relacionados con el mecanismo de acción de los compuestos.

1.5 Es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.¹⁴

2. Procedimiento experimental.

2.1 Sacrificio de los animales por dislocación cervical.

2.2. Se aplica alcohol al 70 % a nivel de abdomen y extremidades inferiores.

2.3 Con tijeras de iris, corte la piel que cubre el fémur, para dejarlo al descubierto. Con tijeras y pinzas de disección, separar los músculos del hueso y seccionarlo por debajo de la rodilla y a nivel de la articulación de la cadera.

2.4 Fracturar la rodilla, con un movimiento en sentido contrario al de la articulación. Esto permitirá desgarrar los músculos insertados y dejar el hueso al descubierto.

2.5 Corte un extremo del fémur.

2.6 Lave la cavidad del hueso con suero bovino fetal (3 mL/animal). Para ello introduzca el fémur en un tubo de ensayo conteniendo el suero bovino fetal y con una jeringuilla con aguja cargue el suero, introduzca la aguja en la cavidad de la médula y expulse gentilmente el contenido para lavar la cavidad (repetir 3 veces). Nunca debe cargar la jeringuilla con la aguja dentro de la cavidad medular.¹⁵

2.7 Centrifugue a 1 000 r.p.m. durante 10 min.

2.8 Elimine el sobrenadante, y deje aproximadamente 0,1 – 0,2 mL sobre el botón celular que se resuspende.

2.9 Tome una gota del botón celular resuspendido y realizar una extensión sobre láminas secas. Codifique las láminas siguiendo una tabla de números aleatorios. Dos láminas/animal.

2.10 Déjelas secar por 24 horas a temperatura ambiente.

2.11 Transcurridas 24 horas, fije las muestras con metanol absoluto durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2.12 Proceda a la tinción con giemsa (5 % en H₂O común). Para cada solución de Giemsa debe estandarizarse el tiempo de tinción que oscila entre 11-15 minutos. La tinción debe posibilitar la distinción entre los eritrocitos jóvenes y maduros.

Los eritrocitos jóvenes o policromáticos (PCE) se tiñen de azul grisáceo y los maduros o normocromáticos (NCE) se tiñen de rosado en un tono claro. Los micronúcleos pueden ser observados en ambos tipos de células, con una forma redondeada característica, como pequeños núcleos teñidos de azul intenso o violeta oscuro, semejante a la tinción de los núcleos normales.¹⁶

2.13 Realice el análisis de las láminas a ciegas, contabilizando:

- a- Cantidad de eritrocitos poli y normocromáticos en 2 000 eritrocitos.
- b- Cantidad de eritrocitos policromatófilos portadores de micronúcleos en 2 000 eritrocitos policromáticos, registrando eritrocitos policromatófilos micronucleados con 1, 2 o más

Para cada animal el análisis debe ser realizado por dos observadores.

2.14 Calcule la relación PCE/NCE como indicador de citotoxicidad.

2.15 Calcule la frecuencia de eritrocitos policromatófilos (EP) micronúcleados.

2.16 La citotoxicidad (PCE/NCE, % PCE) se evalúa primariamente por ANOVA de cumplir los supuestos, sino por el ensayo no paramétrico de Kruskal Wallis, mientras que la frecuencia de EP se evalúa mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de roedores.

Esta metodología es reconocida como útil dentro de las baterías de ensayo de genotoxicidad, tanto por la información que brinda como por su costo.

Procedimiento

1. Selección de los niveles de dosis, sexo, momento del sacrificio vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

1.1 Los criterios para la selección de las dosis se basa en los valores de la LD₅₀ encontrados. El mayor nivel de dosis debe demostrar cierta toxicidad a la médula ósea. A partir de este nivel se deben incluir al menos otros dos inferiores para tratar de demostrar la existencia de un efecto relacionado con las dosis. Cuando no sea determinada la LD₅₀ ó estudios precedentes en este ensayo no den positividad se recomienda utilizar las dosis máximas recomendadas para este ensayo (2 000 mg/kg/día para tratamientos de hasta 14 días y 1 000 mg/kg/día para tratamientos de más de 14 días). Si hay evidencias de que la sustancia no es tóxica se puede emplear un solo nivel de dosis (la máxima).¹⁸

1.2 Ambos sexos pueden ser utilizados en los ensayos con el objetivo de detectar posibles diferencias sexo específicas en la respuesta al agente, no menos de cuatro animales por grupo pueden ser utilizados y analizadas 100 células por animal.¹⁹

1.3 Se realizarán catorce administraciones separadas 24 horas por la vía que resulte común a

la que será utilizada en humanos. Debe incluirse además la vía intraperitoneal como aquella que no presenta factores modificadores del compuesto.²⁰

1.4 Pueden ser utilizados dos tiempos de sacrificio a las 24 horas de la última administración si el tratamiento fue dosis repetidas y a las 24 y 48 horas en caso de dosis únicas, para descartar resultados negativos relacionados con el mecanismo de acción de los compuestos.

1.5 Se formarán tres grupos de la sustancia de ensayo (tres niveles de dosis), es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.

1.6 Antes del sacrificio de los animales se debe administrar colchicina en dosis de 4-6 mg/kg por vía (I.P), en el caso en que sean ratas 2 horas antes, en ratones el tiempo de exposición de la colchicina puede variar siendo de 3-5 horas, en el caso del hámster chino de 4-5 horas.²¹

Procedimiento Experimental.

2.1 Sacrificio de los animales por dislocación cervical.

2.2. Se aplica alcohol al 70 % a nivel de abdomen y extremidades inferiores.

2.3 Con tijeras de iris, corte la piel que cubre el fémur, para dejarlo al descubierto. Con tijeras y pinzas de disección, separar los músculos del hueso y seccionarlo por debajo de la rodilla y a nivel de la articulación de la cadera.

2.4 Fracturar la rodilla, con un movimiento en sentido contrario al de la articulación. Esto permitirá desgarrar los músculos insertados y dejar el hueso al descubierto.

2.5 Corte un extremo del fémur.

2.6 Lave la cavidad del hueso con suero bovino fetal (3 mL/animal). Para ello introduzca el fémur en un tubo de ensayo conteniendo al menos 3 ml de una solución buffer fosfato a pH 7,4 o suero bovino fetal y con una jeringuilla con aguja cargue el líquido, introduzca la aguja en la cavidad de la médula y expulse gentilmente el contenido para lavar la cavidad (repetir 3 veces). Nunca debe cargar la jeringuilla con la aguja dentro de la cavidad medular.

Procedimiento Citogenético.²²

Este procedimiento es común para la obtención de preparaciones citogenéticas de células en metafase:

- 3.1 Centrifugar a 1 200 r.p.m. durante 10 minutos.
- 3.2 Decantar el sobrenadante con ayuda de la pipeta, dejando aproximadamente 0.5 ml en el cual se incluyen restos del sobrenadante y el botón celular.
- 3.3 Despegar las células del fondo del tubo por discretos golpes.
- 3.4 Adicionar gota a gota una pipeta completa de una solución hipotónica de KCl adelgazada, (0,075 Molar o al 28% (0,56 g en 200 ml de agua destilada), resuspender suavemente las células de 20-25 veces y luego enrasar a volumen 8, resuspender 10 veces, en ambas ocasiones con la ayuda del vortex a bajas revoluciones (10-15 Hz o 1200 r.p.m.) o con una pipeta pasteur. De indicarse otro agente a otra concentración en el protocolo, se hará lo que está descrito en éste. No abusar del uso del vortex.²³
- 3.5 Incubar a 37°C durante 20-40 minutos, este tiempo varía según las condiciones ambientales de cada laboratorio, en el nuestro lo hemos estandarizado de 30-35 minutos.
- 3.6 Prefijar la muestra adicionando 6 gotas de la solución fijadora (metanol: ácido acético (3:1), frío), resuspender 5 veces sin ayuda del vortex.²⁴
- 3.7 Reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 3.8 Repetir el paso 3.1
- 3.9 Repetir el paso 3.2 y 3.3
- 3.10 Fijar la muestra adicionando gota a gota la solución fijadora por las paredes del tubo llevándolo a 7 ml de volumen, resuspender 4 veces con la ayuda del vortex (10-15 Hz o 1200 r.p.m.) y/o pipeta pasteur.
- 3.11 Reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 3.12 Repetir el paso 3.1

- 3.13 Repetir el paso 3.2 y 3.3
- 3.14 Adicionar la solución fijadora llevándolo a 5 ml de volumen, con ayuda del vortex (10-15 Hz o 1200 r.p.m.) pero sin resuspender.
- 3.15 Repetir el paso 3.1.
- 3.16 Repetir el paso 3.2 y 3.3.
- 3.17 Repetir el paso 3.14, pero llevándolo a 3 ml de volumen.
- 3.18 Repetir el paso 3.1
- 3.19 Repetir el paso 3.2 y 3.3.
- 3.20 Resuspender de 3 a 4 veces con ayuda de la pipeta.
- 3.21 Montar sobre portaobjetos húmedos extraídos del horno a una temperatura de 60-70°C, esperar de 5 a 6 minutos antes de ser usados para lograr un enfriamiento ligero. Se depositan de 2 a 3 gotas por lámina a una distancia de 30 a 45 cm entre la punta de la pipeta y la lámina a extender.
- 3.22 Dejar secar al aire o a temperatura ambiente. Codificar con tabla de números aleatorios.
- 3.23 Teñir con Giemsa al 10 % durante 10-15 minutos, bajo nuestras condiciones ambientales y materiales el tiempo puede variar desde 25-30 minutos.
- 3.24 Montar con cubre objetos, sellando con bálsamo de Canadá.

Determinaciones de Aberraciones Cromosómicas, conteo de láminas.²⁰

La tinción debe posibilitar la distinción de las metafases o células en metafases, visualizando cuantitativamente y cualitativamente los cromosomas.

4.1 Realizar el análisis a ciegas, se montarán como mínimo 6 láminas por animal, contabilizando: ²⁰

c- Contar 100 metafases leíbles por animal.

d- Determinar el número de aberraciones por célula., número de células con aberraciones,

<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

número total de aberraciones, frecuencia de *gaps* y de *breaks* e intercambios o intracambios en las 100 metafases leíbles por animal.

e- Determinar el índice mitótico (número y % de metafases en 1 000 células leíbles), además del número y % de células con poliploidía en 1 000 células leíbles.

Para cada animal el análisis debe ser realizado por dos observadores, lo que se registra en el modelo anexo.

4.2 Realizar el análisis estadístico de todas las determinaciones excepto la del índice mitótico, mediante la prueba de homogeneidad de (χ^2). En el caso del índice mitótico de existir normalidad y homogeneidad de varianza, será comparado por la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA), de no cumplir tales supuestos los resultados se analizarán con el estadígrafo no paramétrico de Kruskal Wallis. Para ambos casos el nivel de probabilidad prefijado será de $p < 0.05\%$.

Referencias Bibliográficas

1. 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.
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. *Environ and Molec Mutagen* 2003; 41(3):85-91.
3. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ and Molec Mutagen* 2002; 39(2):119-126.
4. Mortelmans K, Rupa D. Current Issues in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56(3):379-397.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 "

- Vivo" Mutagenicity Assays. Genetic Toxicology and Environmental Mutagen 1999; 4(3):313-319.
11. 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.
 12. 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.
 13. Hayashi M, Tice R.R, MacGregor J.T, Anderson D. In Vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res 1994; 312(2):293-304.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.

- 20.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.
- 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.Ecobichon D.J. Mutagenesis, the basis of toxicity testing. Mc Gill University, Montreal. De. CRC, INC, Boca Ratón, Florida; 2001.p.113-136.
- 23.Arencibia D.F, Rosario L.A, Rodríguez Y, López Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. retel (revista de toxicología en línea) 2009; 23(2):8-22.
- 24.Arencibia D.F, Rosario L.A, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. retel (revista de toxicología en línea) 2009; 23(3):23-40.

Recibido: 22/12/09

Aceptado: 28/12/09