

Evaluación de la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en tres ensayos de genotoxicidad potencial.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*1}, Luis Alfredo Rosario Fernández², Yanet Hernández Rodríguez², Dayisell Lazara Curveco Sánchez³.

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

³Centro 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. Teléfono: 057(07)2716911. Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

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. En este artículo tuvimos por objetivo evaluar la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, ensayo micronúcleos de médula ósea y en el ensayo cometa (electroforesis alcalina de células individuales). Para lo cual se utilizaron ratones adultos- jóvenes de ambos sexos, siendo administrados durante 35 días, formándose 4 grupos experimentales, un grupo control negativo, un grupo sustancia vehículo 1 (tween 65 al 2 %), un grupo sustancia vehículo 2 (NaCl al 0,9 %) y por ultimo un grupo control positivo (ciclofosfamida, 50 mg/kg, i.p). Las variables espontáneas e inducidas analizadas fueron, la concentración de espermatozoides, anomalías en la cabeza del espermatozoide de epidídimos de ratones machos, micronúcleos de médula ósea y rupturas de simple cadena y formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica, mediante el ensayo cometa en ratones de ambos sexos. Se concluyó que esta línea de ratón se puede utilizar como biomodelo experimental en estos tres ensayos de genotoxicidad pero como última elección, ya que es menos eficiente que otras líneas de ratón en comercialización como la Balb-C, NMRI y OF-1.

Palabras clave: Espontánea, inducida, morfología de la cabeza del espermatozoides, ensayo de micronúcleos, ensayo cometa, ratones C57BL/6/cenp, ciclofosfamida.

Abstract

Evaluation of the C57BL/6/cenp mice breeds like experimental biomodel in three genotoxicity potential assays.

The genotoxic potential study of new compounds to propose as drugs constitutes a route for the determination of the risk of genetic damage in people exposed. In this sense the genetic toxicology has the responsibility of determining the substances that can be genotoxic potentially for the man, the one which later on will evaluate its use or not, in function of the relationship risk-benefit. In this article we had for objective to evaluate the C57BL/6/cenp mice breeds like experimental biomodel in the head sperms morphology assay, micronuclei of bone marrow assay and comet assay (alkaline electrophoresis of individual cells). We were used young-mature mice of both sexes, being administered during 35 days, being formed 4 experimental groups, a group negative control, a group substance vehicle 1 (tween 65 to 2%), a group substance vehicle 2 (NaCl to 0,9 %) and lastly a group positive control (cyclophosphamide, 50 mg/kg, i.p). The spontaneous and induced variables analyzed were, the concentration of sperms, anomalies in the sperms head of male mice epididymis, micronuclei of bone marrow and the strand breaks (SB) or alkali-labile sites formation on DNA from leukocytes of peripheral blood, by means of the comet assay in both sexes mice. We concluded that you can use the C57BL/6/cenp mice breeds as experimental biomodel in these three genotoxicity assays but as last election, since it is less efficient than others mice breeds in commercialization like the Balb-C, NMRI and OF-1.

Key words: Spontaneous, induced, head sperms morphology, micronuclei assay, comet assay, C57BL/6/cenp mice, cyclophosphamide.

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.^{1,2} 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. 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.^{3, 4}

Dentro de estos ensayos se encuentra el de la morfología de la cabeza del espermatozoide, el cual permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas.⁵ Esta técnica a su vez es sensible, rápida y económica lo cual justifica su uso. Entre los sistemas que se emplean se encuentran los basados en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, este permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales y anormales (con forma de banana, amorfos, sin gancho y con dos colas).⁶

Por su parte el ensayo de micronúcleos de médula ósea, es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH),^{7,8} es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.^{7,9} Este sistema permite registrar in vivo la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.⁹

Por otro lado 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 demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas, el cáncer, y vinculadas al estrés oxidativo.^{10,11} 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.¹²

En este artículo tenemos por objetivo evaluar la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en los tres estudios de genotoxicidad potencial a los cuales se hace alusión anteriormente, para lo cual se reporta la concentración de espermatozoides, la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides de epidídimos de ratones machos y la frecuencia basal o espontánea de micronúcleos de médula ósea y rupturas de simple cadena y formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica, mediante el ensayo cometa en ratones de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos en estos tres ensayos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.¹³

Materiales y Métodos

- **Animales.** Para el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se utilizaron ratones C57BL/6/cenp machos, en el ensayo de micronúcleos de médula ósea y el ensayo cometa se utilizaron ratones de ambos sexos, para el caso de los machos se utilizaron los mismos animales en los tres ensayos. Los ratones eran adultos jóvenes (5-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 28 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^{\circ}$ 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.** 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 el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoides, para el caso del ensayo de micronúcleos de médula ósea y cometa se utilizaron (5 ratones/grupo/sexo), en cada una de las dos series realizadas para un total de 20 ratones/grupo.

En el grupo experimental 1 (control negativo), 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 de los demás grupos.

En el grupo experimental 2 (sustancia vehículo 1), 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,¹⁴⁻¹⁶ administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 3 (sustancia vehículo 2), utilizamos el NaCl al 0,9 %, ya que esta demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar,^{17, 18} administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, siendo adquirida por la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %.¹⁹ La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, en un volumen máximo 15 mL/kg, durante 5 días consecutivos en el caso de los machos y luego se dejó de administrar durante 35 días (tiempo de reposo, el cual coincide con la duración del ciclo espermático del ratón), para el caso de las hembras administradas con el control positivo este fue suministrado 48 y 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita.²⁰

Debemos destacar que al realizar los tres ensayos juntos utilizando los mismos animales machos, el tiempo de exposición o de administración tanto para hembras como para machos fue de 35 días, para de esta forma lograr una reducción de animales en este estudio, así se cumplía el ciclo espermático completo en los ratones machos y las células de la médula ósea y los linfocitos de sangre periférica estaban expuestos a las sustancias de ensayo por un periodo relativamente largo para de existir genotoxicidad y citotoxicidad se manifestará de forma clara y precisa.

- 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, y las hembras tratada con CF fueron sacrificadas 24 horas posteriores a la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.²⁰

- 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.^{5, 6}

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.⁶

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 3 ml de suero bovino fetal. La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos.²¹ Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (Ensayo Cometa). Al constatar la pérdida total de los reflejos, se extrajo una gota

de sangre de la cola la cual era equivalente a 15-20 μ L, para verterla en un vial que contenía previamente 10 μ L de heparina sódica, manipulando las muestras a 4°C. El muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN, para de esta forma disminuir los falsos positivos y que la manipulación no constituyera un factor determinante de los resultados.

Las muestras (15-20 μ L) fueron suspendidas en 140 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 %, luego se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa, se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1 % Tritón, 10 % DMSO, pH 10) por 1,5 h a 4 °C y sometidas a 20 min de desenrollamiento en solución reguladora de electroforesis (3 % NaOH 10 N, 0,5 % EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se realizó a 300 mA y 1 V/cm durante 18-20 min. Las láminas fueron lavadas con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0,4 M a pH 7,5 y aclaradas con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0,05 % y los nucleoides teñidos fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz, por tres observadores independientes, para luego establecer un promedio entre las tres lecturas.^{22, 23}

Se analizaron 200 leucocitos/animal y 100 leucocitos/gel. Cuantificándose 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa fue clasificado acorde a la categoría o grado de daño correspondiente en el ADN entre 0 y 4. La magnitud del daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con Collins en el año 2004,²² con valores posibles en un rango de 0-400. El procedimiento para el cálculo de (UA) puede ser resumido en la siguiente ecuación: UA= 0 x TCG0 + 1 x TCG1+ 2 x TCG2 + 3 x TCG3 + 4 x TCG4.

TCG0= Total de células, grado 0(células no dañadas). TCG1= Total de células, grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN). TCG2= Total de células, grado 2 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN). TCG3= Total de células, grado 3(daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN). TCG4= Total de células, grado 4 (células totalmente dañadas con cometas visibles).

Análisis estadístico. En el caso del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoides 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). En el ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratón la frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El número total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado. En el ensayo cometa para realizar las comparaciones entre todos los grupos en cuanto a las UA y los diferentes niveles de daño, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se estableció a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$ para todas las variables analizadas en este estudio. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados

Tal como se puede observar en las Tablas 1 y 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 y la frecuencia espontánea de anomalías en la cabeza del espermatozoide, tales sustancias se comportan similarmente a dicho control negativo en las dos series evaluadas. A diferencia de lo observado en los grupos tratados con las sustancias vehículo 1 y 2, la CF sí indujo una disminución de la concentración de espermatozoides e indujo un incremento significativo de las formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoide, tal y como esta descrita para este mutágeno.

En cuanto al ensayo de micronúcleos en médula ósea siendo observados los resultados en las Tablas 3 y 4, se puede apreciar que no existen diferencias significativas en cuanto al índice de citotoxicidad dado por la relación EP/EN indicador de la proliferación celular en médula ósea, la cual es similar tanto en el control como en las sustancias vehículo 1 y 2, las células continuaban su fase normal de diferenciación, proliferación y maduración en la médula ósea, de esta misma forma se comportó el índice de genotoxicidad (MN-EP %), el cual no fue modificado con la administración de las sustancias vehículo 1 y 2. No siendo así para la CF la cual modificó de forma desfavorable ambos indicadores, al realizar su efecto clastogénico y

citotóxico aumentando la formación de micronúcleos y favoreciendo que se formen los llamados retardos anafásicos, existiendo diferencias significativas al comparar los resultados de CF con los demás grupos experimentales. El número de EP con 1, 2 o más micronúcleos también fue similar en los grupos tratados con las sustancias vehículos 1 y 2 al compararlos con los animales controles. De igual forma que los parámetros evaluados con anterioridad este indicador de cuan genotóxico pueden llegar a ser las sustancias evaluadas por nosotros fue mayor, significativamente y diferente en los animales tratados con CF.

Por último los resultados obtenidos en el ensayo cometa observados en la Tabla 5, demuestran que no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en ambos sexos en cuanto a las U.A y el % de nucleoides según el grado en daño de leucocitos de sangre periférica. No siendo así para la CF la cual como era de esperar indujo un aumento del % de nucleoides con grado 1, existiendo diferencias significativas tanto con el índice anterior como con las U.A y el % de nucleoides con nivel de daño 2, 3, 4.

Discusión

Dada la n tan grande en nuestro caso y por resultados dados por diversos autores en ratones Balb-C y OF-1, ^{5,13} estos valores constituyen los rangos de frecuencia espontánea en que se mueve la concentración espermática en esta línea de ratón, 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.

En cuanto a la CF tales resultados concuerda con los obtenidos con el uso de este mutágeno por nosotros y otros autores en ensayos realizados con ratas *SD* y ratones OF-1, ^{13, 24, 25} 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.^{5, 24}

A su vez estos resultados nos permiten afirmar que se podría introducir mejor la línea Balb-C a ser utilizada en este ensayo con mayor frecuencia ya que presenta una concentración como promedio mayor a la de los C57BL/6/cenp por tanto aumentaría la facilidad para <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

detectar sustancias mutagénicas que en su mecanismo de acción disminuyen la concentración espermática (ver tabla 6).²⁵

En cuanto a la morfología de la cabeza del espermatozoides resultados observados en la (Tabla 2), analizando la semejanza entre las medias y la no diferencia significativa existente entre el control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en ambas líneas, en cuanto al número de cabezas anómalas y sus clasificaciones, aparejado a la n analizada tan amplia (10 000 células), podemos afirmar que el rango de cabezas anómalas en los espermatozoides de ratones C57BL/6/cenp se encuentra entre 26,9-28,8 bajo nuestras condiciones experimentales en conteo de 500 espermatozoides totales, datos que se encuentran en el rango de los hallados por Piña y Aubele tras resultados obtenidos en sus investigaciones en el año 2005 con el uso de este ensayo en ratones NMRI.^{26,27}

No siendo así para los tratados con CF la cual indujo 99,6 espermatozoide anormales como promedio de un total de 500 espermatozoides analizados, resultado que corrobora su uso como compuesto citotóxico y genotóxico en este modelo,^{6, 28} a la par que valida la conducción de este ensayo bajo nuestras condiciones experimentales.

Teniendo en cuenta el ensayo de micronúcleos se pudo constatar que la línea de ratones C57BL/6/cenp es menos eficiente genéticamente que la Balb-C para ser llevada a cabo su uso en este ensayo ya que presenta un porciento (%) de eritrocitos policromáticos (EP) espontáneos con micronúcleos más alto que está última línea tal como se puede apreciar en las Tablas 3 y 4, además ver las Tablas 12 y 14.²⁵

Por su parte la CF llegó a inducir valores de hasta 1,78 % de EP con micronúcleos.²⁹ De igual forma se demostró que la línea de ratones C57BL/6/cenp es menos susceptible a la CF que la línea Balb-C, dado por tener igualmente la línea C57BL/6/cenp menor % de EP portadores de micronúcleos de forma espontánea que la línea Balb-C.

Los eritrocitos policromáticos con 1, 2 o más de 2 micronúcleos espontáneos se encuentran en el rango de 28-34 EP con micronúcleos totales como promedio. El aumento encontrado en el grupo tratado con CF con valores de 272-285 evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada,³⁰ lo

cual evidencia lo útil que es este mutágeno como control positivo en este ensayo el cual nos permite evaluar a la CF como un potente agente en la formación de micronúcleos.³¹

Según los resultados obtenidos por nosotros observados en la Tabla 5 en cuanto al ensayo cometa, podemos afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales el % de nucleoides espontáneos de grado 0 en leucocitos de sangre periférica en esta especie de ratón en ambos sexos se encuentra entre 46,11-49,10 %, lo cual es bastante bajo al compararse con resultados obtenidos por nosotros en ratones Balb-C, NMRI y OF-1, resultados que actualmente están siendo evaluados por una revista cubana para su posible aceptación a publicar,³² esto demuestra una vez más que esta línea de ratón debe ser utilizada en última instancia como biomodelo experimental en este ensayo. Ya que mientras mayor sea la resistencia espontánea al daño permitirá valorar de forma rápida y concisa un posible desplazamiento de los valores de las determinaciones que se llevan a cabo en este trabajo.³³

Los valores de los resultados obtenidos en los controles negativos y las sustancias vehículos 1 y 2 resultaron ser prácticamente similares, lo cual nos permite afirmar que dichas sustancias se pueden utilizar con confiabilidad a la hora de preparar nuestras suspensiones y emulsiones. Igualmente se destacó la sensibilidad de este biomodelo experimental al daño inducido por la CF, las U.A se encuentran en el rango de 129,87-132,18 destacando de forma veraz la actividad citotóxica y genotóxica de este clastógeno químico.³⁴ Por otra parte al ser diferentes significativamente de forma estadística y biológica evidente los valores de los controles negativos, controles vehículos 1 y 2 en comparación con los tratados con CF, nos permitió corroborar los resultados negativos obtenidos en nuestro ensayo.

Conclusiones

Se concluyó que esta línea de ratón se puede utilizar como biomodelo experimental en estos tres ensayos de genotoxicidad pero como última elección, ya que es menos eficiente que otras líneas de ratón en comercialización como la Balb-C, NMRI y OF-1.

Tabla 1. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones C57BL/6/cenp machos.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	20	42,2 ± 1,1	2,11 ± 0,2
Sustancia vehículo 1	20	41,6 ± 2,0	2,08 ± 0,3
Sustancia vehículo 2	20	40,9 ± 2,8	2,05 ± 0,5
Control positivo (CF) ^a	20	17,6 ± 3,1*	0,88 ± 0,1*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Tabla 2. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones C57BL/6/cenp machos.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	20	473,1±6,8	26,9±6,8	21,2±5,1	1,2±0,3	4,0±4,3	0,5±0,1
Sustancia vehículo 1	20	472,3±9,1	27,7±9,1	21,3±4,4	0,9±0,4	5,1±6,1	0,4±0,2
Sustancia vehículo 2	20	471,2±5,6	28,8±5,6	22,0±3,2	1,0±0,4	5,6±4,8	0,2±0,2
Control positivo (CF) ^a	20	400,4±13,1*	99,6±13,1*	47,9±9,8*	14,6±5,2*	29,0±9,9*	8,1±3,1*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

Determinaciones en 500 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Tabla 3. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones C57BL/6/cenp de ambos sexos.

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
Control negativo	10	1056 ± 11,2	944 ± 11,2	1,12 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Sustancia vehículo 1	10	1060 ± 20,5	940 ± 20,5	1,13 ± 0,03	0,20 ± 0,04
Sustancia vehículo 2	10	1066 ± 26,3	934 ± 26,3	1,14 ± 0,03	0,21 ± 0,04
Control positivo (CF) ^a	10	970 ± 22,4*	1030 ± 22,4*	0,94 ± 0,07*	1,73 ± 0,72*
Hembras					
Control negativo	10	1046 ± 10,0	954 ± 10,0	1,10 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Sustancia vehículo 1	10	1055 ± 20,6	945 ± 20,6	1,12 ± 0,04	0,18 ± 0,05
Sustancia vehículo 2	10	1042 ± 20,1	958 ± 20,1	1,09 ± 0,03	0,21 ± 0,01
Control positivo (CF) ^a	10	963 ± 19,7*	1037 ± 19,7*	0,93 ± 0,04*	1,78 ± 0,81*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales).

Tabla 4. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones C57BL/6/cenp de ambos sexos.

Grupo	n	MN	EP (1 MN)	EP (2 MN)	EP (+2 MN)
Machos					
Control negativo	10	29	22	6	1
Sustancia vehículo 1	10	31	20	10	1
Sustancia vehículo 2	10	34	24	8	2
Control positivo (CF) ^a	10	275*	185*	72*	18*
Hembras					
Control negativo	10	31	23	7	1
Sustancia vehículo 1	10	28	22	4	2
Sustancia vehículo 2	10	33	29	3	1
Control positivo (CF) ^a	10	282*	205*	62*	15*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.
Determinaciones en 2 000 EP/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las dos series experimentales).

Tabla 5. Ensayo Cometa en ratones C57BL/6/cenp de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
			(% Nucleoides)				
Control Negativo	H	55,40 ± 8,34	46,11 ± 7,10	42,90 ± 2,85	5,50 ± 5,99	0,46 ± 0,16	0,03 ± 0,01
	M	60,28 ± 6,41	46,17 ± 6,51	42,29 ± 3,21	7,58 ± 5,00	0,85 ± 0,12	0,07 ± 0,04
Sustancia Vehículo 1	H	59,19 ± 7,43	48,66 ± 7,23	38,73 ± 3,80	8,02 ± 3,78	1,34 ± 0,73	0,10 ± 0,06
	M	60,88 ± 7,52	49,10 ± 8,45	40,34 ± 5,10	8,67 ± 4,92	1,00 ± 0,48	0,05 ± 0,03
Sustancia Vehículo 2	H	56,28 ± 8,10	47,52 ± 8,00	37,29 ± 4,70	6,99 ± 4,70	1,59 ± 0,21	0,06 ± 0,03
	M	63,07 ± 6,19	47,78 ± 9,02	43,84 ± 5,12	7,31 ± 5,51	1,43 ± 0,52	0,08 ± 0,04
Control Positivo (CF) ¹	H	129,87 ± 14,87*	18,81 ± 4,13*	51,62 ± 12,37*	13,22 ± 6,26*	10,31 ± 3,50*	5,22 ± 4,52*
	M	132,18 ± 15,10*	17,53 ± 5,00*	54,61 ± 10,18*	11,69 ± 5,14*	10,49 ± 4,02*	5,68 ± 3,95*

CF (Ciclofosfamida), ¹ Administración por vía i.p.

*p<0.05 (Comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).
(X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Tabla 6. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones Balb-C machos.²⁵

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	30	45,3 ± 2,2	2,27 ± 0,2
Sustancia vehículo 1	30	44,8 ± 3,5	2,24 ± 0,2
Sustancia vehículo 2	30	44,9 ± 1,3	2,25 ± 0,4
Control positivo (CF) ^a	30	16,9 ± 5,3*	0,84 ± 0,5*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas). ^aArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 7. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones OF-1 machos.²⁵

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	30	43,2 ± 4,4	2,16 ± 0,3
Sustancia vehículo 1	30	42,5 ± 3,1	2,13 ± 0,2
Sustancia vehículo 2	30	43,1 ± 3,8	2,16 ± 0,3
Control positivo (CF) ^a	30	18,3 ± 4,1*	0,92 ± 0,4*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 8. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones NMRI machos, vía gástrica.²⁸

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). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 9. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones Balb-C machos.²⁵

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	30	489,3±5,8	10,7±5,8	6,2±5,7	1,2±1,7	2,0±3,8	0,3±1,5
Sustancia vehículo 1	30	483,2±8,3	16,8±5,9	12,0±1,6	1,7±0,3	2,6±3,1	0,5±0,9
Sustancia vehículo 2	30	480,9±3,2	19,1±3,2	11,3±3,1	2,2±1,5	3,9±2,0	1,7±0,1
Control positivo (CF) ^a	30	398,7±7,4*	101,3±7,4*	38,4±7,5*	22,6±4,2*	30,8±7,3*	9,5±2,3*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

Determinaciones en 500 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 10. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones OF-1 machos.²⁵

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	30	476,2±5,6	23,8±5,6	18,9±4,4	1,3±0,4	3,2±2,5	0,4±0,2
Sustancia vehículo 1	30	474,1±8,4	25,9±8,4	19,4±3,5	1,4±0,8	4,8±5,2	0,3±0,1
Sustancia vehículo 2	30	472,8±11,0	27,2±6,0	19,2±5,5	1,7±3,3	5,9±3,9	0,4±0,1
Control positivo (CF) ^a	30	402,6±11,2*	97,4±11,2*	46,6±8,5*	16,1±4,1*	27,4±8,3*	7,3±1,6*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

Determinaciones en 500 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 11. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones NMRI machos, vía gástrica.²⁸

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). ^P Artículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 12. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C de ambos sexos.²⁵

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
Control negativo	15	1081 ± 13,0	919 ± 13,0	1,18 ± 0,01	0,16± 0,03
Sustancia vehículo 1	15	1072 ± 16,6	928 ± 16,6	1,16 ± 0,04	0,18 ± 0,04
Sustancia vehículo 2	15	1087 ± 20,0	917 ± 20,0	1,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04
Control positivo (CF) ^a	15	933 ± 21,3*	1067 ± 21,3*	0,87 ± 0,03*	1,82 ± 0,89*
Hembras					
Control negativo	15	1069 ± 14,9	931 ± 14,9	1,15 ± 0,05	0,13 ± 0,04
Sustancia vehículo 1	15	1077 ± 14,6	923 ± 14,6	1,17 ± 0,02	0,14 ± 0,07
Sustancia vehículo 2	15	1086 ± 22,1	914 ± 22,1	1,19 ± 0,04	0,17 ± 0,08
Control positivo (CF) ^a	15	922 ± 19,8*	1078 ± 19,8*	0,85 ± 0,02*	1,65 ± 0,77*

CF (Ciclofosfamida).^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series experimentales). ^P Artículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 13. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1 de ambos sexos.²⁵

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
Control negativo	15	1067 ± 12,9	933 ± 12,9	1,14 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Sustancia vehículo 1	15	1076 ± 22,7	924 ± 22,7	1,16 ± 0,04	0,20 ± 0,03
Sustancia vehículo 2	15	1071 ± 25,1	929 ± 25,1	1,15 ± 0,05	0,21 ± 0,05
Control positivo (CF) ^a	15	953 ± 20,5*	1047 ± 20,5*	0,91 ± 0,06*	1,89 ± 0,61*
Hembras					
Control negativo	15	1055 ± 11,2	945 ± 11,1	1,12 ± 0,03	0,16 ± 0,05
Sustancia vehículo 1	15	1066 ± 19,5	934 ± 20,2	1,14 ± 0,06	0,18 ± 0,06
Sustancia vehículo 2	15	1062 ± 22,8	938 ± 22,2	1,13 ± 0,05	0,14 ± 0,04
Control positivo (CF) ^a	15	947 ± 18,9*	1053 ± 18,7*	0,89 ± 0,02*	1,78 ± 0,58*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 células/animal. *p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series experimentales). ^P Artículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 14. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C de ambos sexos.²⁵

Grupo	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
Machos					
Control negativo	15	23	17	5	1
Sustancia vehículo 1	15	26	18	7	1
Sustancia vehículo 2	15	25	15	9	1
Control positivo (CF) ^a	15	258*	153*	84*	21*
Hembras					
Control negativo	15	19	12	6	1
Sustancia vehículo 1	15	20	12	8	0
Sustancia vehículo 2	15	24	18	5	1
Control positivo (CF) ^a	15	233*	141*	73*	19*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.
Determinaciones en 2 000 EP/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las tres series experimentales). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 15. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1 de ambos sexos.²⁵

Grupo	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
Machos					
Control negativo	15	26	20	5	1
Sustancia vehículo 1	15	28	19	8	1
Sustancia vehículo 2	15	30	20	9	1
Control positivo (CF) ^a	15	267*	180*	71*	16*
Hembras					
Control negativo	15	22	18	3	1
Sustancia vehículo 1	15	25	17	6	2
Sustancia vehículo 2	15	20	13	6	1
Control positivo (CF) ^a	15	251*	173*	65*	13*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.
Determinaciones en 2 000 EP/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las tres series experimentales). ^PArtículo publicado por Arencibia y colaboradores, 2009.

Tabla 16. Resultados Correspondientes al Ensayo de Micronúcleos Ratones NMRI en diferentes series experimentales.³⁵

Grupos	Dosis mg/kg	Vía	EP	EN	%EP	EP/EN	MN [⊗]	MN/EP [⊗] (x10 ³)
Control negativo	-	-	6336	5664	52,63 (48,3-57,4)	1,12 (0,93-1,35)	36 (1-5)	3,00 (1-3,5)
Control negativo	-	-	6427	5573	53,56 (46,8-59,8)	1,15 (0,87-1,49)	28 (0-7)	2,33 (0-4)
Goma acacia /agua 10mg/ml	10	oral	6401	5599	53,34 (47,2-60,2)	1,14 (0,89-1,51)	21 (1-6)	1,75 (0,5-3,0)
Goma acacia /agua 10mg/ml	10	oral	6471	5529	53,92 (49,5-56,7)	1,17 (0,98-1,40)	25 (2-6)	2,08 (1,0-3,0)
Ciclofosfamida	50	IP	4944	7056	41,20** (30,3-46,9)	0,70** (0,43-0,89)	391 (45-86)	32,58** (22,5-43,0)
Ciclofosfamida	50	IP	5025	6975	41,88** (34,3-45,6)	0,72** (0,52-0,84)	445 (40-89)	37,08** (20,0-44,5)

() Valores mínimos y máximos reportados por animal, * p<0.01 Test de Kruskal-Wallis.

⊗ Número de EP con micronúcleos, * p<0.01 Test de la U de Mann Whitney.

⊕ Valores determinados en 12 000 EP. ^PArtículo publicado por Gámez y colaboradores, 2000.

Tabla 17. Frecuencia espontánea e inducida en el Ensayo de Micronúcleos con Ratonés NMRI.³⁵

Grupos	Dosis mg/kg	Vía	células analizadas	EP	EN	%EP	EP/EN	MN [⊗]	MN/EP [⊗] (x10 ³)
Control	-	-	48 000	25 635	22 365	53.4 (46.8-59.8)	1.14 (0.79-1.59)	110 (0-7)	2.29 (0-4)
Ciclosfosfamida	50	IP	24000	9 969	14 031	41.20 ⁺ (30.3-46.9)	0.71 ^{**} (0.43-0.89)	836 (40-89)	34.83 ^{**} (20.0-44.5)

() Valores mínimos y máximos reportados por animal, * p<0.01 Test de Kruskal-Wallis.

∅ Número de EP con micronúcleos, + p<0.01 Test de la U de Mann Whitney.

⊗ Valores determinados en 48 000 EP. [Ⓟ]Artículo publicado por Gámez y colaboradores, 2000.

Referencias Bibliográficas

1. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Poddar G, Nandy AK. 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. Mortelmans K, Rupa D. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56:379-397.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Cox SH, Ann M. *Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing*. Second Edition, Revised and Expanded. Research Triangle Park, North Carolina; 1999.p.178-179.
8. Schmid W. The micronucleus assay validation. *Mutation Research* 1975; 24:9-11.
9. Alamone MF. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1994; 23:239-240.
10. Sina JF, Bean CL, Dysart GR, Taylor VI, Bradley MO. Evaluation of the alkaline elution/hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mutat Res* 1983; 113:357-91.
11. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11):874-97.
12. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-191.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Shayne CG. *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.
19. 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.
20. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodriguez 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.p.2-3.
21. Hayashi M, Tice R, MacGregor JT, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research* 1993; 5:120-134.
22. Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. *Mol. Biotech* 2004; 26:249-61.

23. Lee R, Steinert S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res* 2003; 544:43-64.
24. 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.
25. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 24(2):7-29.
26. Piña B, Solís MJ, Quintanilla B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 202(2):189-198.
27. 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.
28. Arencibia DF, Rosario LA, 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.
29. Schmid W. The *in vivo* micronucleus test in mice. *Mutat Research* 1981;31:9-15.
30. Mac Gregor JT, Wehr CM, Gould DH. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen* 1999; 2:509-514.
31. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present and Future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1991; 18:277-279.
32. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y. Comparación entre tres líneas de ratones en la frecuencia espontánea e inducida de rupturas de simple cadena y formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica, mediante el Ensayo Cometa. *Biología Aplicada* 2010; en arbitraje, datos de archivos.

33. Rodríguez G, Cancino L, Prieto EA, Espinosa J. El Tinidazol induce roturas de simple cadena en leucocitos de ratón. Anuario Toxicología 2001;1(1):57-64
34. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical Mutagens. In: United Kingdom edition published. Principles and Methods for their detection. 2nd ed (vol 2). England; 1978.p.135-136.
35. 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, Ciencias Biológicas 2000; 31(3):211- 216.

Recibido: 02/01/10

Aceptado: 04/02/10