

La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina.

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

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

²Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

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

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

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Teléfono: 057(07)2715013. Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

El ensayo de micronúcleos en médula ósea es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea. 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. En este artículo decidimos evaluar la rata Sprague Dawley en ambos sexos como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. Para lo cual se formaron 5 grupos experimentales/sexo, el primero administrado con NaCl al 0,9% por vía intraperitoneal (i.p), el segundo y el tercero administrados con ciclofosfamida por vía i.p, con diseños de tratamientos diferentes en dosis de 50 mg/kg. El cuarto y quinto grupo fueron administrados con bleomicina por vía i.p, igualmente en dos diseños de tratamientos diferentes en dosis de 40 mg/kg. Al final de la experiencia se obtuvieron mayores resultados de inducción de micronúcleos con el uso de la ciclofosfamida, administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio en ratas SD de ambos sexos. Lo cual constituye bajo nuestras condiciones experimentales el mejor diseño experimental para inducir la formación de micronúcleos en células de la médula ósea de roedores, aumentando considerablemente la frecuencia espontánea presente en esta especie de rata, útil en estudios de evaluación de drogas antigenotóxicas *in vivo*.

Palabras clave: Inducción, micronúcleos, ratas Sprague Dawley, ciclofosfamida, bleomicina.

Abstract

The Sprague Dawley rats as biomodel in the induction of micronuclei in bone marrow cells by cyclophosphamide and bleomycin.

The micronuclei assay in bone marrow is easily to reproduce and its offer clear information on the cellular proliferation in bone marrow. This system allow registering *in vivo* the capacity of the chemical substances to induce chromosomics ruptures to interfere or the chromosomes metaphases migration during the mitosis of the somatic cells. In this article we decide to evaluate the Sprague Dawley rats in both sexes as biomodel in the induction of micronuclei in bone marrow cells by cyclophosphamide and bleomycin. Which were formed 5 experimental groups per sex, the first administered with NaCl 0,9 % by intraperitoneal (i.p) route, the second and third groups were administered with cyclophosphamide by i.p route, with designs of different treatments at doses of 50 mg/kg. The fourth and fifth groups were administered with bleomycin by i.p route, equally in two designs of different treatments at doses of 40 mg/kg. At the end of the experience obtained higher results of the micronucleis inductions with the use of cyclophosphamide was administered 48 and 24 hours before sacrifice in SD rats of both sexes. That which constitutes in our experimental conditions the best experimental design to induce the micronucleis formation in bone marrow cells of rodents, increasing considerably the spontaneous frequency to present in this species of rat, useful in evaluation studies on *in vivo* antigenotoxic drugs effects.

Key words: Induction, micronuclei, Sprague Dawley, cyclophosphamide, bleomycin .

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} Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer.^{3, 4}

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

El ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores, es un ensayo incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH),^{6,7} es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.^{7,8} 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.⁸

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL),⁹⁻¹² la primera constituye un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los

mecanismos reparativos;¹³ y la segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN; al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres.^{14,15}

Ambas drogas son utilizadas con gran efectividad como antineoplásicas. La ciclofosfamida pertenece al grupo cloro-etilaminas, con el desarrollo de éste agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral. Considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular.¹⁶ En tanto la bleomicina es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales.^{14, 15} Las células tumorales son más susceptibles a la bleomicina durante la proliferación activa y son demoradas específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular.¹⁶

Existe gran polémica sobre los diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutagénicas como controles positivos en los ensayos de mutagénesis y/o genotoxicidad. Así como diversas dosis han sido utilizadas, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal respondedor a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

Por lo cual en este artículo decidimos evaluar en ratas SD de ambos sexos, la respuesta a ciclofosfamida y a bleomicina, administradas por vía intraperitoneal (i.p), diferenciado la respuesta a ambos mutágenos cuando son administrados 48 y 24 horas antes del sacrificio y cuando es administrado 24 antes del mismo, en el ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea.

Materiales y métodos

- Animales.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-210 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de

Laboratorio de la República de Cuba.

- **Administración y dosificación.**

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 (5 ratas/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratas/grupo/sexo/.

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza. Administrado por vía i.p, en dosis de 2 mL/kg en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones.

En los grupos experimentales 2 y 3 se utilizó la CF, adquirida de la firma comercial mexicana Lemri S.A bajo la marca LEDOXINA. Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 2 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 3. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg,¹⁷ por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.¹⁸

En los grupos experimentales 4 y 5 se utilizó la BL, adquirida de los Laboratorios PISA, S.A. de C.V. México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo). Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 4 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 40 mg/kg,¹⁹ por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.

- **Observaciones clínicas.**

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

- Sacrificio.

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical con previa atmósfera de éter, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 4 el sacrificio fue 24 h después de la segunda administración de cada sustancia, en el caso de los grupos experimentales 3 y 5 el sacrificio se realizó 24 horas posteriores a la única administración del mutágeno.

- Exámenes realizados.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratas.

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.²⁰ 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.²⁰ Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión). 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.²⁰

- Análisis estadístico.

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables continuas frecuencia de EP portadores de micronúcleos e índice de citotoxicidad (EP/EN),²⁰ 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 se analizaron con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha = 0.05$. Las variables categóricas (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,²⁰ el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0.01$. Todos los análisis se realizaron

empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y discusión

En ninguna de las dos series experimentales, ni en ninguno de los grupos presentes en este estudio se encontraron animales con signos clínicos indicativos de toxicidad.

Tal como se observa en la tabla 1, la CF administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio difirió de forma estadística con el otro grupo tratado con este mismo mutágeno, con los dos grupos tratados con la BL y el grupo control negativo. Sin embargo no difirieron los resultados obtenidos en la administración única de CF con los dos grupos tratados con BL, ni entre estos dos últimos. Con el uso de la CF administrada en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones se obtuvieron los resultados más bajos, que se traduce en mayor índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN en ambos sexos, en los machos los valores estuvieron entre $0,87 \pm 0,02$ y en las hembras fueron de $0,86 \pm 0,04$.

Además se corroboró los resultados espontáneos de citotoxicidad en esta especie de rata los cuales se encontraron en el caso de los machos $1,26 \pm 0,04$ y en las hembras de $1,24 \pm 0,06$. Los resultados más altos, es decir menor efecto citotóxico se encontraron en los animales tratados con BL solamente 24 horas antes del sacrificio obteniéndose valores de $0,98 \pm 0,04$ en los machos y de $0,97 \pm 0,48$ en las hembras.

Teniendo en cuenta el índice de genotoxicidad se observa que nuevamente la CF administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio difirió con los demás grupos, tanto con el control negativo como con la CF administrada en dosis única como con los dos grupos tratados con BL. Obteniéndose resultados que van desde $1,67 \pm 0,43$ % de eritrocitos policromáticos con micronúcleos en los machos y $1,77 \pm 0,56$ % en las hembras. Además este estudio permitió corroborar los resultados espontáneos en la especie de rata evaluada los cuales se encuentran entre $0,18 \pm 0,06$ % en los machos y $0,24 \pm 0,04$ en las hembras. Por otro lado la CF administrada en dosis única no difirió con los dos grupos tratados con la BL, ni tampoco hubo diferencias al comparar los dos grupos de BL con diseños de administración diferentes.

En la tabla 2 se observan los resultados pertenecientes al número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos. Se observó al realizar una comparación entre mutágenos que la CF administrada en dos ocasiones difiere de los dos diseños en que se administró la BL, además al comparar los resultados utilizando el mismo mutágeno este grupo nuevamente difirió con el grupo en que se administró la CF en dosis única. Todos los grupos tratados con mutágenos difirieron con el control negativo, siendo válidos nuestros resultados.

El número más alto de micronúcleos totales se obtuvo con la administración de CF en dos ocasiones, siendo de 238 en los machos y de 251 en las hembras, en donde se observaron igualmente el mayor número de eritrocitos con más de dos micronúcleos, experimentando el mayor efecto genotóxico de este clastogéno químico, en los machos fue de 18 y 14 en las hembras. El número más bajo de inducción de micronúcleos totales se obtuvo al administrar la BL en dosis única, con valores en los machos de 162 y en las hembras de 149. Además se corroboró que el total de micronúcleos espontáneos en médula ósea en esta especie se encuentra entre 25 en los machos y 34 en las hembras.

La no presencia de síntomas clínicos de toxicidad en ningunos de los grupos de este estudio evidencia que las dosis utilizadas no son tóxicas a nivel sistémico si siendo en el órgano diana evaluado.^{17, 22}

La diferencia estadística encontrada entre la CF administrada en dos ocasiones y la administrada en dosis única tanto en los indicadores de genotoxicidad como de citotoxicidad, pudo haber estado dada por ser este clastogéno químico un promutágeno. El hecho de administrar en dos ocasiones potencia su acción, además de ser el factor tiempo de metabolismo por el hígado para crear los metabolitos activos causantes de su efecto genotóxico, un parámetro importante a tener en cuenta.^{16, 23}

Este estudio permitió concluir que es más factible administrar la CF en dos ocasiones, si se quiere inducir eficientemente la formación de micronúcleos en médula ósea de ratas SD de ambos sexos. Además estos resultados son de gran utilidad en estudios de antigenotoxicidad *in vivo* de cualquier producto a evaluar.^{19, 24,25}

En tanto la diferencia estadística encontrada al comparar la CF administrada en dos ocasiones con los dos tratamientos en los que se utilizó la BL, pudiera estar dada por el mecanismo por los cuales operan cada uno de estos mutágenos o por la susceptibilidad especie dependiente a cada uno de los mutágenos evaluados y las dosis utilizadas. Resultados similares se obtuvieron al evaluar la línea de ratones Balb-C en el ensayo de aberraciones cromosómicas,²⁶ pero no concuerda en su totalidad con los obtenidos por nosotros en un estudio de aberraciones cromosómicas en esta misma línea de ratas.²⁷ Donde no se observaron diferencias significativas entre la CF y la BL administradas en dos ocasiones.²⁷ Lo que nos hace pensar que el factor predominante pudiese ser los efectos mutagénicos que induce la CF vinculados a su mecanismo, siendo detectados por este ensayo con alta especificidad y fidelidad, y en menor medida el factor especie.

La CF se ha destacado en la formación de monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos, la cual aumenta la aparición de retardos anafásicos en células somáticas, destacándose como clastogéno químico de gran potencia.^{13, 16, 21, 28} Este efecto mutagénico al parecer induce mayor daño o es capaz de detectarlo este ensayo, lo cual lo hace ser en nuestros días la técnica validada de mayor utilidad y de menor costo, en cuanto a detectar sustancias que inducen daños genotóxicos cromosomales en células hematopoyéticas.²⁹ El efecto mutagénico de la BL esta dado en la inducción de labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres^{14,15,30} lo cual trae consigo la aparición de aberraciones sobre todo rupturas de cromátides, huecos, fragmentos y translocaciones, éstas últimas en menor medida.¹³

Estos resultados presuponen una gran utilidad, ya que permiten utilizar el mejor diseño para inducir una cantidad considerable de micronúcleos en médula ósea de ratas SD de ambos sexos, lo cual se utilizaría en diseños experimentales de evaluación de drogas con efectos antigenotóxicos demostrados mediante este biomodelo *in vivo*.^{19,24}

Conclusiones

Se observaron marcadas diferencias significativas en cuanto a los índices de genotoxicidad y citotoxicidad entre los resultados de los animales tratados con la CF administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio en ambos sexos de ratas SD con el otro diseño utilizando CF y los dos grupos tratados con BL. Lo cual presupone que bajo nuestras condiciones experimentales este es el mejor diseño experimental para inducir la formación de micronúcleos en células de la médula ósea de roedores, aumentando considerablemente la frecuencia espontánea presente en esta especie de rata. Siendo útil estos resultados en estudios de evaluación de drogas antígenotóxicas *in vivo*. No obstante se evidenció una alta sensibilidad de esta línea de rata en ambos sexos a la acción de ambos mutágenos independientemente del esquema de tratamiento utilizado.

Tabla 1. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley de ambos sexos tratadas con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupo	n	EP ^T	EN ^T	EP/EN ^T	MN-EP (%) ^T
Machos					
CN ^a	10	1116 ± 10,21	884 ± 10,21	1,26 ± 0,04	0,18 ± 0,06
CF1 ^a	10	930 ± 17,45aAc	1070 ± 17,45aAc	0,87 ± 0,02aAc	1,67 ± 0,43aAc
CF2 ^a	10	976 ± 4,32 c	1024 ± 4,32c	0,95 ± 0,05c	1,22 ± 0,35c
BL1 ^a	10	981 ± 6,85bc	1019 ± 6,85bc	0,96 ± 0,03bc	1,18 ± 0,47bc
BL2 ^a	10	989 ± 4,66bc	1011 ± 4,66bc	0,98 ± 0,04bc	1,14 ± 0,51bc
Hembras					
CN ^a	10	1109 ± 10,63	891 ± 10,63	1,24 ± 0,06	0,24 ± 0,04
CF1 ^a	10	924 ± 9,48aAc	1076 ± 9,48aAc	0,86 ± 0,04aAc	1,77 ± 0,56aAc
CF2 ^a	10	963 ± 3,22c	1037 ± 9,48c	0,93 ± 9,48c	1,09 ± 0,20c
BL1 ^a	10	972 ± 5,31bc	1028 ± 9,48bc	0,95 ± 9,48bc	1,11 ± 0,28bc
BL2 ^a	10	983 ± 4,44bc	1017 ± 9,48bc	0,97 ± 9,48bc	1,05 ± 0,36bc

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con p<0.05 prefijada. (X media; DE desviación estándar, para las dos réplicas experimentales).

CF1=Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. CF2=Ciclofosfamida administrada 24 horas antes del sacrificio.

BL1=Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. BL2=Bleomicina administrada 24 horas antes del sacrificio. ^a Administración por vía ip. Determinaciones en 2 000 células/animal.

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo.

(A) Resultados que difieren al comparar los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo.

(c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo (CN).

Tabla 2. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley de ambos sexos tratadas con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupo	n	MN ^T	EP (1 MN) ^T	EP (2 MN) ^T	EP (+2 MN) ^T
Machos					
CN ^a	10	25	19	5	1
CF1 ^a	10	238aAc	150aAc	70aAc	18aAc
CF2 ^a	10	174c	120c	47c	7c
BL1 ^a	10	168bc	118bc	45bc	5bc
BL2 ^a	10	162bc	115bc	42bc	5bc
Hembras					
CN ^a	10	34	26	7	1
CF1 ^a	10	251aAc	153aAc	84aAc	14aAc
CF2 ^a	10	155c	119c	33c	4c
BL1 ^a	10	158bc	122bc	30bc	6bc
BL2 ^a	10	149bc	117bc	27c	5bc

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba no paramétrica de χ^2 , con p<0.01 prefijada.

CF1=Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. CF2=Ciclofosfamida administrada 24 horas antes del sacrificio.

BL1=Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. BL2=Bleomicina administrada 24 horas antes del sacrificio. ^a Administración por vía ip. Determinaciones en 2 000 EP/animal.

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo.

(A) Resultados que difieren al comparar los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo.

(c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo (CN).

Referencias Bibliográficas

1. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar J.N, Poddar G, Nandy A.K. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 534:133-143.
2. Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular mutagenesis* 2003; 41:85-91.
3. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39:119-126.
4. Mortelmans K, Rupa D. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56:379-397.
5. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiol* 2000; 134:756-760.
6. 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.
7. Schmid W. The micronucleus assay validation. *Mutation Research* 1975; 24:9-11.
8. 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.
9. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 1999; 189:157-165.
10. Sorsa M, Ojajarvi A, Salomaa S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals. *Teratogen, Carcinogen, and Mutagen* 1999; 10:215-221.
11. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse DG, Bootman J. *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney; 1990.p.115-141.

12. Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH. Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res* 1994; 312:305-312.
13. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997; 70(1):84-89.
14. Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez AJ, Davison GP, León OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 2000; 42:565-573.
15. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 2001; 15:581-585.
16. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet* 1999; 19(2):1-8.
17. Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas *Sprague Dawley* como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Arg Vet* 2010; 27(264):1-13.
18. Arencibia DF, Rosario LA, 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* 2009; 23(2):8-22.
19. Díaz S, González I, González R, Coll F. Evaluación antigenotóxica *in vivo* de un análogo de brasinosteroides. *Rev Cub Farm* 2008; 42(Sup Esp 3):75-76.
20. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 2009; 25(3):22-38.
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. 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. *Rev Tox* 2009; 26(1):47-50.

23. Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug resistance, and the feature. En: Hoffman R, et al eds. Hematology: basic principles and practice. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.p.915-940.
24. Matuo R, Oliveira RJ, Silva AF, Mantovani MS, Ribeiro LR. Anticlastogenic Activity of Aqueous Extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing Cells (HTCs) During Cell Cycle. Toxic Mech Meth 2007; 17(3):147 -152.
25. Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Yang CS. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. Cancer Res 1994; 54(17):4641-4647.
26. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. Comparación de la respuesta de ratones Balb-C frente a dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas. Rev Arg Vet 2010; 27(265). Aceptada, en prensa.
27. Arencibia DF, Rosario LA. Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. Retel 2010; 28(1):1-14.
28. Henderson L, Fedyk J, Windebank S, Smith M. Induction of Micronuclei in Rat Bone Marrow and Peripheral Blood Following Acute and Subchronic Treatment with Azathioprine. Mutation Res 1993; 291:79-85.
29. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel 2009; 23(3):23-40.
30. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. Rev Cubana Invest Biomed 2001; 20(1):48-53.

Recibido: 09/04/10

Aceptado: 10/04/10