

Trabajo Original

Toxicología Experimental

## **Evaluación Citogenotóxica y Teratogénica de una bebida energizante en sangre periférica de ratón Árabe por medio del ensayo de micronúcleos.**

**Flores-Maya Saúl<sup>1\*</sup>, De Allende-Becerra Estefanía<sup>3</sup>, Jiménez-Guillén Raúl Alberto<sup>3</sup>, Vega-Galeana Elián<sup>3</sup>, Barrera-Escorcia Héctor<sup>2</sup>, María del Pilar Villeda Callejas<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, C.P. 54090. Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO.

<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, C.P. 54090. Laboratorio de Microscopía.

<sup>3</sup>Universidad del Valle de México campus Lago de Guadalupe Prolongación. Paloma No.7 Col. Lago de Guadalupe, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.C.P.54760.

\*Correspondencia a: [saulsel@unam.mx](mailto:saulsel@unam.mx)

---

## Resumen

Las bebidas energizantes incluyen combinaciones de electrolitos, cafeína o estimulantes para brindar energía al organismo y ayudar a realizar distintas actividades. Pero su consumo indebido puede traer consecuencia a la salud humana. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico y teratogénico in vivo de una bebida energizante de marca comercial. Se emplearon ratones machos y hembras de la línea Árabe los cuales fueron provistos de alimento especial para roedores y la bebida energizante sola y combinada con una bebida alcohólica ad libitum. Se evaluó el efecto citogenotóxico en sangre periférica de los roedores por medio del ensayo de micronúcleos. Transcurrido el tiempo de gestación del ratón hembra, las crías vivas o muertas fueron analizadas morfológicamente. Como control positivo se usó la ifosfamida. Los análisis estadísticos (ANOVA y la prueba de Dunnett  $p < 0.05$ ), permitieron establecer que los tratamientos tenían diferencias significativas tanto en el análisis de la toxicidad y genotoxicidad en células sanguíneas de ratón Árabe. No hubo efectos teratogénicos en las crías de los ratones. En conclusión: los componentes químicos de la bebida energética provocan daño clastogénico y son ligeramente tóxicos en células de sangre periférica del ratón Árabe. La mezcla de la bebida energizante con vodka es clastogénica y citotóxica. El consumo prolongado de vodka mostró efectos genotóxicos y citotóxicos en las células sanguíneas de los ratones.

**Palabras clave:** Sangre periférica, ratón Árabe, células policromáticas, células normocromáticas.

---

**Abstract**

***Evaluation of the Cytogenotoxicity and Teratogenicity of an energy drink in peripheral blood of Arabic mouse by the micronucleus test.***

Energy drinks include combinations of electrolytes, caffeine or stimulants to provide energy to the body and assist in various activities. But their abuse can bring to human health consequences. The aim of this study was to evaluate the genotoxic and teratogenic effect in vivo of an energy drink known commercial brand. Adult male and female Arabic mice were used; they were housed in groups of five and had free access to food, an energy drink, vodka, an energy drink mix with vodka and water ad libitum. Genotoxic effect was evaluated in peripheral blood of rodents using the Micronucleus Test. After the gestation period and birth of mice, living or dead offspring were analyzed morphologically. Ifosfamide was used as a positive control. Statistical analysis (ANOVA and Dunnett's test  $p < 0.05$ ), allowed to establish that the treatments had significant differences in the toxicity and genotoxicity in Arabic mouse blood cells. In the analysis there was no death or teratogenic morphological and physiological damage in offspring. There were no teratogenic effects in offspring of mice. In conclusion: The chemical components of the energy drink cause clastogenic damage and are slightly toxic to Arabic mouse peripheral blood cells. The mixture of energy drink and vodka is clastogenic and cytotoxic. Long-term consumption of vodka showed genotoxic and cytotoxic effects in blood cells of mice.

**Key words:** Peripheral blood, Arabic mouse, polychromatic cells, normochromatic cells.

## Introducción

En el ámbito internacional, la evaluación genotóxica de alimentos sintéticos es un requisito de carácter obligatorio y, aunque no existe un consenso generalizado sobre qué tipos y qué cantidad de ensayos de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, a los productos químicos, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante dichos ensayos. El uso de las células de sangre periférica de ratón han sido usadas para pruebas citogenéticas desde hace cinco décadas. Este sistema tiene una base de datos muy grande con una extensiva lista de agentes químicos probados (1) En el presente siglo esta prueba citogenética ha sido utilizada para monitorear la citogenotoxicidad en algunos fármacos, alimentos y bebidas que se introducirán al mercado (2,3).

Desde hace algunos años el mercado internacional se ha inundado de las bebidas que han sido denominadas energizantes las cuales, según sus productores, fueron creadas para incrementar la resistencia física, proveer reacciones más veloces y mayor concentración, aumentar el estado de alerta mental, evitar el sueño, proporcionar sensación de bienestar, estimular el metabolismo y ayudar a eliminar sustancias nocivas para el cuerpo (4,5).

La base de sus "cualidades energéticas" se atribuyen a dos ingredientes principales: la taurina y la cafeína. También contienen diferentes ingredientes adicionales donde sobresalen la guaraná, el ginseng, la glucuronolactona y diferentes vitaminas del complejo B (4).

Algunos estudios han demostrado que la cafeína puede tener efectos adversos para la salud. Sobre todo a dosis altas. Promoviendo la diuresis y natriuresis (6), así como la reducción de la sensibilidad insulínica (7), y eleva la tensión arterial (8).

En México, el 60% de los jóvenes entre los 16 y 30 años son los que consumen las bebidas energizantes combinándolas con alcohol, poniendo en riesgo su vida. Según una investigación realizada por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos

Sanitarios (COFEPRIS), los jóvenes toman hasta 2 ½ Litros de estas bebidas en cada una de sus salidas en la noche (9).

Dentro de las Normas mexicanas se considera que los productos de uso médico y para consumo alimenticio para la población humana, deben someterse a pruebas de citogenotoxicidad o mutagenicidad para prevenir riesgos a la salud (9).

Sin embargo, no se tienen estudios genotóxicos, ni teratogénicos concretos acerca de las posibles secuelas que estas bebidas puedan tener. Es por ello necesaria la realización de estudios sobre los posibles daños que estas puedan causar a las siguientes generaciones teniendo como pauta los estudios recientes acerca de las enfermedades a nivel: sistema nervioso, digestivo y cardiaco.

Por todo esto en este trabajo se planteó el siguiente objetivo: analizar la consecuencia del consumo de esta bebida a nivel citogenotóxico y teratogénico en sangre periférica de ratón de la cepa Árabe.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales y Bebida*

Para evidenciar la actividad genotóxica y teratogénica se utilizaron 25 ratones de la cepa Árabe de ambos sexos, con un peso aproximado entre 20-30 gramos, con edad de 9 semanas, estos animales fueron proporcionados por la tienda +KOTA sucursal Galerías, Atizapán.

El trato y el mantenimiento de los animales siguieron los protocolos establecidos por la Norma Oficial Mexicana 3R (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los ratones fueron puestos en condiciones de laboratorio. Después de una semana de aclimatación, los organismos fueron divididos en cinco lotes. Cada lote con cinco ratones.

Todas las bebidas evaluadas fueron obtenidas en un supermercado: latas de la bebida energizante (marca comercial conocida) con contenido neto de 235 ml, número de lote 11E002013 y un contenido energético de 411 KJ (98kcal) (Tabla 1) y una botella de Vodka (origen Ruso, importado) (43% de alcohol) con contenido neto de 950 ml.

### *Diseño experimental*

Los lotes fueron distribuidos de la siguiente manera: un control negativo administrado solo con agua destilada *ad libitum*; un control positivo que correspondió a la exposición en 0.3 ml de ifosfamida que se aplicó solo una vez a los ratones de forma intraperitoneal y que corresponde a una dosis de concentración de 60 mg/Kg de peso. Se eligió a la ifosfamida (Ifex®) como control positivo por ser un agente alquilante que produce un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos a 24 y 48 hs de exposición en sangre de ratón (10). Finalmente se diseñaron tres lotes experimentales que fueron asignados de la siguiente forma: 1) a la exposición solamente con la bebida energizante; 2) la bebida energizante combinada con vodka en una proporción 3:1 y 3) solo con vodka. Cada uno de los tratamientos fue administrado por un período de 30 días de forma *ad libitum*. Se considero que cada ratón consumía aproximadamente entre 5 a 6 ml diarios de la bebida expuesta en cada lote por lo que los bebederos fueron suministrados con 30 ml diarios para cada tratamiento.

Posterior a la administración de las bebidas, se procedió a extraer sangre realizando una punción en la zona caudal de los ratones a las 24, 48 y 72 hs. y a los 15, 16 y 17 días. La gota de sangre fue colocada sobre una laminilla y se procedió a realizar un frotis (tres laminillas por ratón). Inmediatamente se fijaron las muestras con metanol. Las laminillas fueron sometidas a un tren de tinción de hematoxilina/eosina por 10 minutos.

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones fueron contabilizadas auxiliándose de un microscopio óptico Motic B1 y

posteriormente fotografiadas con una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. En donde se observó un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de micronúcleos (MCN) en células policromáticas (MCNCP) por ratón y por día. El porcentaje (%) de toxicidad se calculó de la siguiente manera: % Toxicidad:  $[\text{No de CP}/\text{No de CN}] \times 100$  y % Genotoxicidad:  $\% \text{MCN} = \text{No. de MCN en CP} / 2000 \text{ células totales} \times 100$  (11, 12, 13, 14, 15,16).

Los datos se organizaron en tablas y los resultados promediados fueron analizados estadísticamente con la prueba paramétrica ANOVA de un factor y una prueba de comparación múltiple conocida como Dunnett ( $p < 0.05$ ) (17).

#### *Análisis teratogénico*

Se considero un tiempo de gestación aproximado en el ratón de la cepa árabe de 28 días, transcurrido este tiempo, las crías nacieron y se registraron los siguientes datos: Número de crías vivas, número de crías muertas, daños fisiológicos (en caso de presentarse alguno) y resultado de autopsia de las crías muertas (18).

## **Resultados**

Con la finalidad de resolver siguiente cuestión ¿Por qué el consumo de la bebida energética provoca citogenotoxicidad y/o efectos teratogénicos en ratón árabe?, los promedios de cada uno de los tratamientos, tanto en la determinación del % de toxicidad y del % de genotoxicidad, fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Los resultados de esta prueba fueron:  $F_{(obs)} = 2.26 >$

$F_{16,51}^{0.05} = 1.84$  y  $F_{(obs)} = 11.68 > F_{16,51}^{0.05} = 1.84$  para el % de toxicidad y el % de genotoxicidad, respectivamente. Estos resultados muestran que hubo alguna diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Por tanto, se procedió a la aplicación de la prueba de comparación Múltiple de Dunnett utilizando un nivel de confianza de  $\alpha 0.05$  (Tabla 2). Así se determinó que en las células de la sangre periférica

de los ratones hubo un incremento significativo en el % de la toxicidad por el consumo durante 16 días de la bebida energizante (Fig. 1A). En el tratamiento de la mezcla de la bebida energizante con vodka (3:1) la toxicidad en la sangre de los roedores se incrementó a los 15 y 16 días de estar consumiendo dicha mezcla (Fig. 1B). En el consumo de vodka el incremento de toxicidad en la sangre de los ratones inició a las 24 horas hasta los 16 días de haber estado expuestos a esta bebida (Fig. 1C).

Con respecto a los datos del % de genotoxicidad, los tres tratamientos mostraron un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en las células policromáticas de la sangre de los roedores. El consumo de la bebida energizante por 72 hs incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos (Fig. 2A). Fue notable observar que en el tratamiento de la mezcla de la bebida energizante con vodka tuvo un incremento significativo en un promedio de 0.515 en la frecuencia de micronúcleos en las células policromáticas de los roedores (Tabla 2; Fig. 2B), este promedio fue muy similar entre las frecuencias de micronúcleos del tratamiento con la bebida energizante (0.23) y el tratamiento con vodka (0.91) administrados individualmente (Tabla 2). Finalmente el tratamiento con vodka tuvo diferencias significativas con la media del control negativo (agua destilada) y que de acuerdo a los resultados de la prueba de Dunnett, el efecto es notable a las 72 hs después del consumo de esta bebida por los ratones (Fig.2C).

Para dar un seguimiento de la funcionalidad del experimento se empleó como control positivo a la ifosfamida(19). Este es considerado un agente químico clastogénico (20), lo cual fue confirmado en el presente estudio (Tabla 2).

Después del tiempo de gestación de las hembras expuestas a los tratamientos, tuvieron alumbramientos entre 4 a 9 crías las cuales nacieron vivas y sin ningún problema morfológico o fisiológico.



## Análisis de Resultados

La citotoxicidad puede ser determinada por la tasa de disminución o aumento de la proporción de células policromáticas entre las células normocromáticas en sangre periférica de ratones. En este estudio es evidente que la bebida energizante por sí sola y su combinación con vodka, y el consumo solo de vodka aumentaron significativamente la proporción de estas células con referencia a un grupo control expuesto solo al consumir agua destilada. Esto demostró, que la bebida energizante y el vodka tienen un efecto estimulador en la síntesis y multiplicación de eritrocitos. Este efecto podría ser causado por la bebida energizante ya que esta contiene vitamina B12 que es un factor necesario en la producción de glóbulos rojos, puesto que las células madre de la médula ósea deben multiplicarse muy rápidamente para producir glóbulos rojos, la falta de vitamina B12 origina anemia (21). De tal forma que permitió inferir, sí los eritrocitos derivan de las células madre (médula ósea) conocidas como hemocitoblasto, entonces, la bebida tiene algunos componentes químicos que se relacionan a la eritropoyetina, que es una hormona de crecimiento producida en los tejidos renales, y que estimula a la eritropoyesis, que a su vez es responsable de mantener una masa eritrocitaria en un estado constante (22).

Este tipo de bebidas suelen contener una concentración alta de sales (sodio 1.8 g), esto causo la presencia abundante de células de eritrocitos crenados en los tratamientos con la bebida sola y mezclada con vodka.

Actualmente se sabe que la cafeína por sí sola es capaz de inducir daño cromosómico en células de mamíferos *in vitro*. Este daño genético fue evaluado usando la prueba de micronúcleos *in vitro* (23). En el presente estudio la mezcla de los compuestos cafeínicos (0.2 %) y taurínicos (800 mg), contenidos en la bebida energizante (Tabla 1), podrían ser los causantes en el aumento de la frecuencia de micronúcleos en células policromáticas, provocando en estas células daños clastogénicos

o aneugénicos. Uno de las consecuencias o relación de estos daños están asociados a la formación o predisposición a algún tipo de cáncer.

Choy y colaboradores en el año de 1995, demostraron los efectos inhibitorios del etanol en la inducción de micronúcleos de ratones CD1 expuestos a uretano con dosificaciones de 2500 mg/kg de etanol; el uretano es uno de los compuestos nitrogenados genotóxicos común en bebidas alcohólicas (24). Este proceso de inhibición de la frecuencia de micronúcleos no sucedió en este estudio. Como se observa en la Fig. 3C y en la Tabla 2 la bebida energizante mezclada con vodka y en el grupo tratado solo con vodka presentaron efectos de toxicidad y genotoxicidad muy significativos, es decir, que la cafeína, la taurina y el alcohol etanol (43%) coadyuvan para provocar el incremento de micronúcleos. De esta observación trae como sugerencia evitar consumir bebidas alcohólicas mezcladas con alguna bebida energizante.

En cuanto a los efectos teratogénicos se pudo observar que la bebida energizante, la bebida alcohólica y la mezcla de estas dos, no provocan teratogenicidad, ya que las crías nacieron sanas y sin daños fisiológicos.

## **Conclusiones**

La genotoxicidad y toxicidad de la bebida energética sobre las células de sangre periférica del ratón Árabe se debe a los componentes químicos que contiene esta bebida, como son la cafeína, la taurina y el complejo de vitaminas B.

Las bebidas alcohólicas con un alto grado de alcohol (43%) solas y mezcladas con bebidas energizantes son clastogénicas o aneugénicas y tóxicas.

Los resultados obtenidos en este estudio y de acuerdo a la literatura los efectos clastogénicos o aneugénicos que tiene esta bebida y su combinación con alcohol, , tienen como consecuencia la asociación a cáncer y a enfermedades celulares.

Esta bebida energizante no provoca teratogenicidad,

Debido a que las células humanas tienen un sistema metabólico muy parecido a las células de estos roedores, estas conclusiones podrían ser parcialmente aplicables o deducibles al sistema humano.

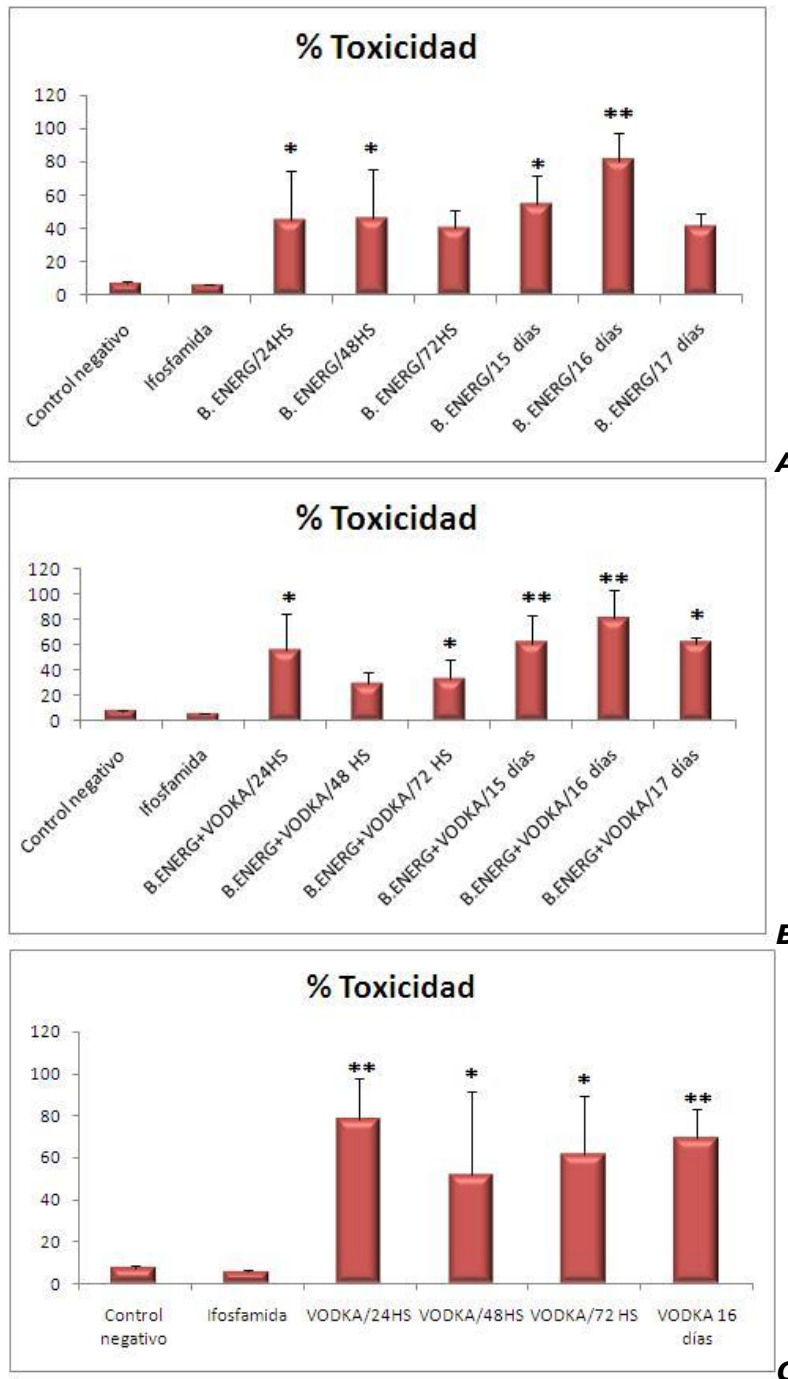
**Tabla 1.** Contenido de la bebida energizante señalados en la latas utilizadas para este estudio.

Compuesto	Cantidad
Proteínas	0.9 g
Sodio	1.8 g
Carbohidratos	20.3 g
De las cuales azúcares	19.1 g
Grasas	2.0 g
Cafeína	0.2 %
Taurina	800 mg
Fibra dietética	1.2 g
Guaraná	5.8%
Glucuronolactona	480 mg
Inositol	40 mg
Niacina	90% VNR
Vitamina B6	90% VNR
Vitamina B12	90% VNR
Ácido Pantoténico	90% VNR

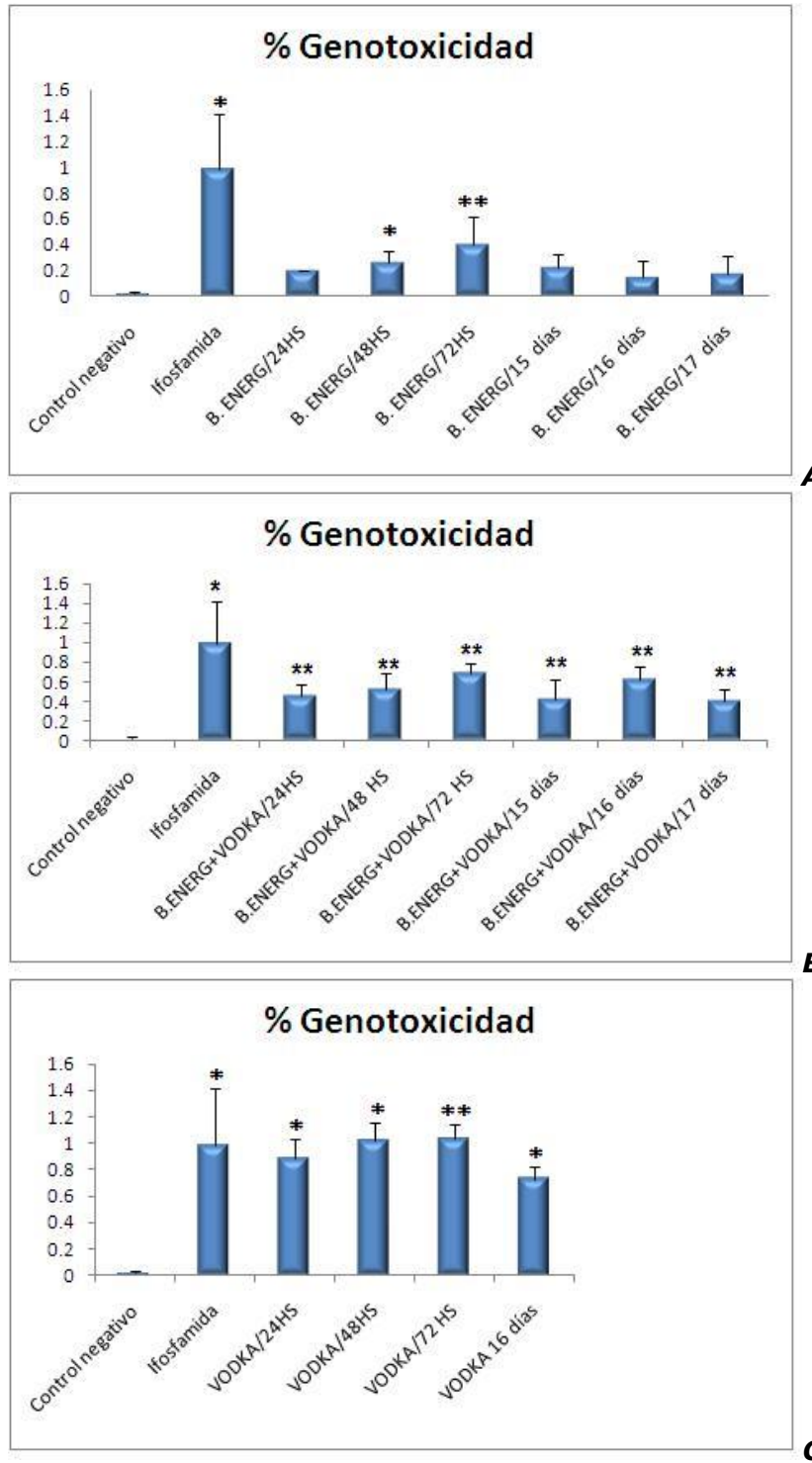
**Tabla 2.** Efecto sobre la proporción de células policromáticas y células normocromáticas (%T) y en la frecuencia de micronúcleos (%G) en células policromáticas de sangre periférica de ratón Árabe por el consumo de un bebida energizante sola, mezclada con vodka y solo vodka. \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  en Prueba ANOVA de un factor y \*\*Múltiple de Dunnett con control negativo. Promedio de 8000 células entre un tratamiento y su repetición.

TRATAMIENTO	CEP/CENX100 % Toxicidad $\bar{X} \pm D. E.$	MCNCEP/2000X100 % Genotoxicidad $\bar{X} \pm D. E.$
Control negativo H <sub>2</sub> O	7.55 ± 1.33	0.025 ± 0.01
Control positivo Ifosfamida 60 mg/Kg 24 Hs.	6.07 ± 0.33	0.987 ± 0.43*
B. ENERGIZANTE 24 Hs	45.00 ± 29.9*	0.20 ± 0.0
B. ENERGIZANTE 48 Hs	46.25 ± 28.8*	0.26 ± 0.09*
B. ENERGIZANTE 72 Hs	40.75 ± 10.21	0.40 ± 0.21**
B. ENERGIZANTE 15 días	55.00 ± 16.5*	0.22 ± 0.1
B. ENERGIZANTE 16 días	80.75 ± 16.1**	0.15 ± 0.12
B. ENERGIZANTE 17 días	41.25 ± 8.18	0.17 ± 0.14
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 24 Hs	55.50 ± 29.5*	0.46 ± 0.11**
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 48 Hs	29.20 ± 9.25	0.52 ± 0.17**
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 72 Hs	33.25 ± 15.3*	0.69 ± 0.10**
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 15 días	61.00 ± 22.6**	0.42 ± 0.20**
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 16 días	80.25 ± 23.3**	0.62 ± 0.14**
B. ENERGIZANTE MEZCLA VODKA 17 días	61.00 ± 4.7*	0.40 ± 0.12**
VODKA 24 Hs	78.00 ± 19.9**	0.88 ± 0.15*
VODKA 48 Hs	51.50 ± 39.9*	1.02 ± 0.14*
VODKA 72 Hs	61.50 ± 27.9*	1.03 ± 0.11**
VODKA 15 días	69.20 ± 14.0**	0.73 ± 0.09*

**Fig. 1.** Valores de la proporción entre células policromáticas y células normocromáticas en sangre periférica de ratón Árabe expuestas a una bebida energizante comercial sola (A) y mezclada con vodka (B) y solo con vodka (C). Datos promedio y su desviación estándar de 8000 células entre un tratamiento y su repetición. \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  en Prueba ANOVA de un factor y \*\*Múltiple de Dunnett con control negativo. Promedio de 8000 células entre un tratamiento y su repetición.



**Fig. 2.** Valores de la frecuencia de micronúcleos en células policromáticas en sangre periférica de ratón Árabe expuestas a una bebida energizante comercial sola (A) y mezclada con vodka (B) y solo con vodka (C). Datos promedio y su desviación estándar de 8000 células entre un tratamiento y su repetición. \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  en Prueba ANOVA de un factor y \*\*Múltiple de Dunnett con control negativo. Promedio de 8000 células entre un tratamiento y su repetición.



## Referencias Bibliográficas

1. Te-Hsiu Ma, Zhidong Xu, Chengen Xu, Heike McC, Valtierra RE, Arreola G A, Hongen Zhang. The improved *Allium/ Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*. 1995; 334: 185-195.
2. Askin CT, Sultan AÖ. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biologia Bratislava*. 2007 ; .62(3): 292-296.
3. Attia SM, Aleisa AM, Bakheet SA, Al-Yahya A A, Al-Rejaire SS,. Ashour AE, A-Shabahah OA. Molecular Cytogenetic Evaluation of the Mechanism of Micronuclei Formation Induced by Camptothecin, Topotecan, and Irinotecan. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2009; 50: 145-151.
4. Aguilar OM, Galvis CF, Heredia HA, Restrepo A. Efecto de las bebidas energizantes con base en taurina y cafeína sobre la atención sostenida y selectiva entre un grupo de jóvenes entre 18 y 22 años. *Revista Iberoamericana de Psicología: Ciencias y Tecnología*. Colombia. 2008.
5. Heckman MA, Sherry K, González de Mejía E. Energy drinks: An assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionally and regulations in the United States. *Comprehensive reviews in Food science and Food safety*. 2010. vol.9.
6. Riesenhuber A, Boehm M, Posch M, Aufricht C. Diuretic potential of energy drinks. *Amino Acids*. Austria. 2006.
7. Lee SJ, Hudson R, Kilpatrick K, Graham TE, Ross R. Caffeine ingestion is associated with reductions in glucose uptake independent of obesity and type 2 diabetes before and after exercise training. *Diabetes Care*. 2005. vol.8
8. Savoca M, Canner E, Wilson M. The association of caffeinated Beverages with blood pressure in adolescents. *American Medical Association*. EUA. 2004.
9. COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra riesgos Sanitarios). Recomendaciones sanitarias sobre el consumo de bebidas "energizantes" <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=bebidas%20energizantes&client=cofepris&ts=all&geo=0> Accesado julio 2013; [en línea] 2010.
10. Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Dorado V, Espinosa-Aguirre JJ. Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutation Research* 2001; 480-481: 171-178.
11. Wakata A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N, Awogi T, Kondo K, Hayashi M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1998; 32: 84-100.

- 12.** Hayashi MJT, Mac Gregor JT, Gatehous GD, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 35(3): 234-252.
- 13.** Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 2000; 455: 155-166.
- 14.** Hamada S, Sutou S, Morita T, Wakata A, Asanami S, Hosoya S, Ozawa S, Kondo K, Nakajima M, Shimada H, Osawa K, Kondo Y, Asano N, Sato S, Tamura H, Yajima N, Marshall R, Moore C, Blakey DH, Schechtman LM, Weaver JL, Torous DK, Proudlock R, Ito S, Namiki C, Hayashi M. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001; 37(2): 93-110.
- 15.** Remigio M A, Ferrer JP, Hurtado Y.V, Ferrelá CR, Carballo C. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2007;12(2): p.0-0. [En Línea] SSN1028-4796 [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962007000200002&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962007000200002&lng=es&nrm=iso)
- 16.** Cotelle S, Testolin RC, Foltête AS, Rissardi GB, Silveira RA, Radetski CM. Genotoxicity potential of a new natural formicide. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012; 19: 628-635.
- 17.** Te-Hsiu Ma, Zhoug X, Arreola GG, Leucona SU. Mouse-erythrocyte micronucleus (Mus-EMN) assay on the clastogenicity of industrial wastewater. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 1995; 11(2): 95-98.
- 18.** Salvatori F, Talassi C, Spinosa H, Bernardi M. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier Science vol. 26. 2004.
- 19.** Arencibia DF, Rosario LA. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Revista Iberoamericana de toxicología en línea*. [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/20003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf) Accesado Diciembre 2010; [en línea] 2003.
- 20.** Calabresi P, Parks R. Agentes citostáticos y drogas usadas para la inmunosupresión. En: *Las Bases farmacológicas de la Terapéutica*. Goodman y Gilman. Ed. Panamericana, México. 1985. 1187 pags.

21. [Longo](#) DL, [Fauci](#) AS, [Kasper](#) DL, [Hauser](#) SL, [Jameson](#) JL, [Loscalzo](#) J. Harrison's Principles of Internal Medicine:, 18th Volumes 2Edition. Mc Graw Hill Medical New York. 2011; 862-867 pags..
22. [Guyton](#) AC. Tratado de Fisiología Médica. 11ªed., Ed. [Elsevier, España](#). 2006;1152 pags.
23. [Dunn](#) TL, [Gardiner](#) RA, [Seymour](#) GJ, [Lavin](#) MF. Genotoxicity of analgesic compounds assessed by an in vitro micronucleus assay. Mutation Research, 1987; 189(3): 299-306.
24. [Choy](#) WN, [Black](#) W, [Mandakas](#) G, [Mirro](#) EJ, [Black](#) HE. A pharmacokinetic study of ethanol inhibition of micronuclei induction by urethane in mouse bone marrow erythrocyte. Mutation Research. 1995; 342:255-263.

**Recibido: 24/06/13**

**Aceptado: 24/07/13**