

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS
"VICTORIA DE GIRÓN"
INSTITUTO FINLAY

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOMODELOS MURINOS EN LOS ENSAYOS
DE GENOTOXICIDAD Y ANTIGENOTOXICIDAD**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la
Salud**

DANIEL FRANCISCO ARENCIBIA ARREBOLA

La Habana

2014

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS
"VICTORIA DE GIRÓN"
INSTITUTO FINLAY

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOMODELOS MURINOS EN LOS ENSAYOS
DE GENOTOXICIDAD Y ANTIGENOTOXICIDAD**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de
la Salud

Autor: Dr. MVZ Daniel Francisco Arencibia Arrebola, MSc.

Tutores: Lic. Alexis Vidal Novoa, Dr C.
Dr. MV Yolanda Emilia Suárez Fernández, Dr C.

Asesor: Dr. MV Juan Francisco Infante Bourzac, Dr C.

La Habana

2014

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a muchas personas, pero quizás se me quede alguien sin mencionar, espero me disculpen por mi falta de memoria.

En primer lugar a mi madre por ser la persona más importante en mi vida y por ser el motivo de avance y superación del día a día.

A mis tutores, ellos son el Dr.C Alexis Vidal Novoa y la Dra.C Yolanda Emilia Suárez Fernández. A mi asesor el Dr.C Juan Francisco Infante Bourzac.

Al MSc Luis Alfredo Rosario Fernández, viste Luiso al fin lo logré con sacrificio pero acá estoy Dr.C.

A Daniel Alejandro por apoyarme siempre en los buenos y malos momentos, gracias por resistirme.

A toda mi familia por ser muy unida, en especial a mi hermana Alegna, mi prima Odalgys y mis tíos.

A mis amigos a los que están y a los que no están, en especial a Dayisell y Lilita.

A los Dr.C Victoriano Gustavo Sierra y la Dr.C Beatriz Tamargo Santos por su apoyo en todas las etapas antes de la defensa final de esta tesis de doctorado, gracias a los dos por tenderme la mano cuando más lo necesitaba y por tener mucha paciencia conmigo, gracias por sus consejos.

A los que viven lejos que en su momento me ayudaron y formaron parte de mi vida, y hoy me apoyan con la parte logística de toda esta ardua tarea en especial a Daysi, mil gracias.

A mis oponentes de la predefensa la Dra.C Bárbara O González Navarro y el Dr.C Julio César Fernández Travieso, muy buenas sus oponencias sin dudas mejoró en calidad la tesis, gracias por sus esfuerzos que fueron grandes.

Por último y de mayor importancia agradecer a los que ya no están, gracias a mis dos abuelas, a mi papá, mi prima Tania y a la virgen por estar siempre a mi lado y acompañarme en mis caídas y en mis grandes logros.

A todos gracias por existir, Que Dios los BENDIGA.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC: Aberraciones Cromosómicas.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

GPT: Glutámico Pirúvico Transaminasa.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BL: Bleomicina.

CF: Ciclofosfamida.

DL₅₀: Dosis Letal Media.

EMCE: Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide.

EN: Eritrocitos Normocromáticos.

EP: Eritrocitos Policromáticos.

EPA: Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos de América.

EROS: Especies Reactivas del Oxígeno.

GC: Gota citoplasmática.

i.p: Intraperitoneal.

ICH: Conferencia Internacional de Armonización.

IM: Índice Mitótico.

MN: Micronúcleos.

NOAEL: Efectos adversos no observados.

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SD: Sprague Dawley.

SLA: Sitios Lábilés al Alcali.

UA: Unidades Arbitrarias.

ppm: Partes por millón.

AVMA: American Veterinary Medical Association.

DMSO: Dimetil Sufóxido.

EGC: Espermatozoides con gota citoplasmática.

CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.

SÍNTESIS

En Cuba no existen publicados valores de referencia de los índices de daños espontáneos e inducidos determinados en los diferentes ensayos de genotoxicidad *in vivo*, que sirvan como punto de comparación entre los diferentes productos que se investigan y los de referencia. Además, se desconoce la eficiencia intrínseca de una especie o línea en particular para detectar sustancias con bajo potencial genotóxico, lo cual al sugerir el uso específico de una de ellas, le otorgaría a los ensayos de genotoxicidad mayor sensibilidad, especificidad metodológica y robustez. Por otro parte, en ensayos de antigenotoxicidad *in vivo*, no se establecen posibles diseños experimentales armonizados que tengan en cuenta la dosis, vía, tipo de mutágeno a utilizar y el número de exposiciones; siendo estos aspectos necesarios en el establecimiento de guías regulatorias para este tipo de ensayos. En esta investigación se establecieron los rangos de daño al ADN espontáneos e inducidos con ciclofosfamida (CF) mediante ensayos citogenéticos en ratones de las líneas BALB/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6 y ratas de las líneas Sprague Dawley (SD), Lewis y Wistar. Además, se comparó la eficiencia de diferentes biomodelos murinos que se desarrollan y comercializan en Cuba en ensayos de genotoxicidad, teniendo en cuenta los resultados de daño al ADN, mediante el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica, micronúcleos y aberraciones cromosómicas de células de la médula ósea y la morfología de la cabeza del espermatozoide. La línea de ratón y de rata más sensible se evaluó como biomodelo en ensayos de antigenotoxicidad, utilizando dos mutágenos con administraciones en tiempos diferentes. Para determinar el nivel de aplicabilidad de estos resultados se utilizó la línea más sensible al evaluar el efecto genotóxico *in vivo* de un extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet administrado por vía oral. Se concluye, que la especie murina más sensible son los ratones BALB/c, con excepción en el ensayo cometa donde la especie más sensible son las ratas SD. El mejor diseño para ensayos *in vivo* de antigenotoxicidad, tanto en ratas SD como en ratones BALB/c, fue la administración de CF en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones, por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg y por último al utilizar la línea más sensible, se demostró que el extracto oleoso evaluado no posee efecto genotóxico *in vivo* a diferentes niveles de daño al ADN, sin embargo al administrarse durante 35 días por vía oral (2 000 mg/kg) fue citotóxico en células germinales de ratones BALB/c machos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	4
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Fuentes de exposición de los seres vivos a las sustancias tóxicas ambientales	6
2.2. ¿Cómo responden los organismos ante los agentes tóxicos?	7
2.3. Movimiento de los agentes tóxicos en el organismo	7
2.4. El metabolismo de las sustancias tóxicas	10
2.5. Evaluaciones toxicológicas. Consideraciones generales	12
2.6. Toxicología genética	13
2.7. Efectos adversos de las mutaciones	14
2.8. Los agentes genotóxicos y el daño genético	15
2.9. Metabolismo de los agentes genotóxicos	16
2.10. Interacciones con el ADN	17
2.11. Los compuestos químicos genotóxicos	18
2.12. Los productos naturales (mezclas complejas)	19
2.13. Ensayos de genotoxicidad. Generalidades	20
2.14. Estrategias regulatorias para ensayos de genotoxicidad	23
2.14.1. Estudios mutagénicos y genotóxicos <i>in vitro</i> más utilizados	24
2.14.2. Estudios genotóxicos <i>in vivo</i> más utilizados	25
2.15. Mutágenos controles positivos más utilizados en ensayos de genotoxicidad <i>in vivo</i> y su mecanismo mutagénico	30
2.15.1. Ciclofosfamida	30
2.15.2. Bleomicina	30
2.16. Biomodelos experimentales en ensayos de genotoxicidad, uso de diferentes especies	31
2.17. Biomodelos de antigenotoxicidad <i>in vivo</i> , situación actual	32
2.18. Potencial farmacológico y toxicológico de derivados de <i>Carapa guianensis</i>	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35

3.1. Materiales y métodos generales _____	35
3.1.1. Aspectos éticos _____	35
3.1.2. Animales _____	35
3.1.3. Condiciones de tenencia y alimentación _____	35
3.1.4. Evaluación clínica _____	35
3.1.5. Métodos de eutanasia _____	36
3.1.6. Técnicas citogenéticas que se emplearon _____	36
3.1.6.1. Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (ensayo cometa alcalino) _____	36
3.1.6.2. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea _____	37
3.1.6.3. Ensayo citogenético de aberraciones cromosómicas en eritrocitos de médula ósea _____	38
3.1.6.4. Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide _____	38
3.2. Comparación del daño genotóxico espontáneo e inducido a diferentes niveles de expresión en el ADN entre varias líneas de ratón y de rata _____	39
3.2.1. Diseño experimental _____	39
3.2.1.1. Criterios de comparación y evaluación de la eficiencia en las técnicas citogenéticas realizadas _____	39
3.2.1.2. Administración y dosificación _____	40
3.3. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en diferentes diseños experimentales en la línea de ratón y de rata seleccionada como biomodelos de antigenotoxicidad _____	41
3.3.1. Diseño experimental _____	41
3.3.1.1. Criterios de aceptación de los diferentes diseños en que se utilizaron los mutágenos para inducir daño al ADN _____	41
3.3.1.2. Administración y dosificación _____	41
3.3.1.2a. Administración y dosificación en el ensayo de antigenotoxicidad de EMCE _____	42
3.4. Evaluación del efecto genotóxico del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet a diferentes niveles de expresión de daño al ADN utilizando la línea murina más sensible _____	42
3.4.1. Extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet utilizado _____	43
3.4.2. Diseño experimental _____	43
3.4.2.1. Administración y dosificación _____	43
3.5. Análisis estadístico _____	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	45
4.1. Comparación del daño genotóxico espontáneo e inducido a diferentes niveles de expresión en el ADN entre líneas de ratón y de rata _____	45

4.1.1. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre ratones de ambos sexos de las líneas BALB/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6	45
4.1.2. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre ratas de ambos sexos de las líneas Sprague Dawley, Lewis y Wistar	52
4.1.3. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre la línea de ratón y de rata más sensible	57
4.2. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en diferentes diseños experimentales en la línea de ratón y de rata seleccionada como biomodelos de antigenotoxicidad	66
4.2.1. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratas SD de ambos sexos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo cometa alcalino	66
4.2.2. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo de micronúcleos de eritrocitos de médula ósea	67
4.2.3. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo de aberraciones cromosómicas de eritrocitos de médula ósea	70
4.2.4. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c machos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide	72
4.3. Evaluación del efecto genotóxico del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet a diferentes niveles de expresión de daño al ADN utilizando la línea murina más sensible	75
4.3.1. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley	75
4.3.2. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratones BALB/c	79
4.3.3. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet en el ensayo de aberraciones cromosómicas en eritrocitos de médula ósea de ratones BALB/c	81
4.3.4. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de <i>Carapa guianensis</i> Aublet en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones BALB/c machos	84
5. CONCLUSIONES	90
6. RECOMENDACIONES	91
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8. ANEXOS	111

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

Las investigaciones que se relacionan con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, esto se debe al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno (Angerer y col., 2007). 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 provocará el aumento 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 (Azqueta y col., 2009). Tercero, el origen ambiental del cáncer (Azqueta y col., 2009; Lamadrid y col., 2011).

Los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan posterior a los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies, por al menos, dos vías de administración de manera independiente. Con estos estudios se explora el riesgo asociado a daños directos o indirectos sobre el material genético, donde una respuesta positiva deroga por lo general el paso del producto a un segundo nivel de evaluación (Giri y col., 2002).

En este sentido, las agencias reguladoras elaboraron protocolos estrictos para la realización de los mismos y sugieren cual o cuales de ellos utilizar en cada momento, legándole un peso preponderante a los ensayos *in vivo* (Armeni y Damiani, 2004). Estos ensayos además de ser costosos, tienen como principal desventaja la inexistencia de un consenso para el uso exclusivo de una especie animal que reproduzca fielmente los procesos fisiológicos a semejanza con los humanos. Como regla general el grupo de mamíferos que más se utilizan son los roedores.

Durante la experimentación animal resulta imprescindible contar con rangos normales de referencia de los parámetros espontáneos de los animales, porque permiten evaluar el estado higiénico sanitario y fisiológico de los animales en una etapa determinada del experimento, a la vez que ayudan a conocer la incidencia o alteraciones sobre el organismo animal que producen las sustancias de ensayo (Balkaya y col, 2001; Marshall y col., 2010).

La necesidad de establecer una base de comparación ha desencadenado numerosas investigaciones con animales controles y aparentemente sanos (Balkaya y col., 2001). Numerosos investigadores de todo el mundo han informado previamente los rangos de comportamiento

normal para las variables hematológicas, bioquímicas de animales de diferentes especies y además, han reportado diferencias bien fundamentadas entre los géneros, la edad y el peso corporal. Es importante estandarizar algunos factores que, según se conoce con anterioridad, pueden inducir grandes variaciones sobre estos parámetros; tales como: la especie, línea, dieta y condiciones ambientales. El medio ambiente influye en la variación genética tanto en el genotipo como en el fenotipo (Repetto y Repetto, 2009), siendo la caracterización de las colonias por parte de las empresas que desarrollan y comercializan modelos experimentales, un objetivo a priorizar. En Cuba no existen publicados valores de referencia espontáneos en los índices de daños que determinan diferentes ensayos de genotoxicidad *in vivo*, que sirva como medio de comparación entre los valores de ensayos de genotoxicidad de diversos productos que se investigan, aún cuando se cuenta con numerosas referencias de artículos donde se citan los valores de los controles negativos de diversos diseños experimentales, en roedores obtenidos de CENPALAB. Otro aspecto a declarar es el uso de las diferentes líneas genéticas del biomodelo por conveniencia, pero en la generalidad de los casos esta decisión está lejos de un basamento teórico-práctico que justifique la selección, dado por la falta de estudios sobre este aspecto. Por lo que los resultados que se obtienen por diferentes grupos de investigación que trabajan productos similares o del mismo grupo en diferentes momentos no puedan ser comparables, debido a que se conoce que las diferencias genéticas entre las líneas del biomodelo presentan diferencias en la expresión de los daños a nivel del genoma (Lambert y col., 2005). Esta problemática conduce a pensar que en la actualidad solo aquellos productos que son muy seguros o muy genotóxicos son verdaderamente clasificados, mientras que, aquellos capaces de causar “pequeños” daños pudieran estar mal clasificados (Kirkland y col., 2005); de ahí la importancia de realizar un estudio comparativo de las tasas espontáneas e inducidas de daños genéticos en las líneas genéticas de ratones y ratas a diferentes niveles de expresión y a través de diferentes técnicas, de forma tal, que les permita a los toxicogenéticos contar con resultados de referencia a la hora de seleccionar la línea genética de ratones y de ratas para realizar los estudios de mutagénesis y carcinogénesis. Existe gran polémica sobre los diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutagénicas en los ensayos de antígenotoxicidad *in vivo*. Diversas dosis se utilizan, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal que responda

sensiblemente a la acción de la sustancia mutagénica inductora de daño al ADN. Los diversos biomodelos que se utilizan en estos ensayos y la no armonización en dosis, vía, mutágeno efectivo y número de veces en que es expuesto el animal al mutágeno, hacen que se cuestionen los resultados de la inducción del daño al ADN y por tanto poca credibilidad del posible efecto reparador del daño a inducir de un producto a evaluar. Estos aspectos son necesarios en el establecimiento de guías regulatorias para ensayos de antigenotoxicidad *in vivo*. Por lo que la mayoría de las sustancias con efecto antigenotóxico hasta el momento solo se evaluaron en ensayos de genotoxicidad y/o mutagénesis *in vitro* (Weisburger, 2001; Gentile y col., 2001; Celikler y col., 2008; Leyva y col., 2010, 2010a; Blasi y col., 2012).

Por otra parte, los extractos naturales son útiles como referencia en la evaluación genotóxica a diferentes niveles de daño, las mezclas complejas se utilizan para evaluar diferentes vías de daño al ADN mediante un número considerable de técnicas citogenéticas y así definir el potencial genotóxico de nuevos principios activos. El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet, pertenece a la familia Meliaceae, es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo; en Cuba se conoce como Cedro Macho. La caracterización del aceite de la semilla de *Carapa guianensis* reveló la presencia de ácidos grasos merístico, palmítico, oleico, linoleico y algunos terpenoides (Qi y col., 2004).

Recientemente se demostró el efecto antioxidante del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* mediante la administración oral del extracto durante tres semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, co-administradas con una sustancia oxidante, se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno (Alonso y col., 2012). Pero se desconoce su efecto en el ADN, tomando en consideración este hallazgo, se utilizó el extracto oleoso antes mencionado como modelo para demostrar la utilidad y la eficiencia que conlleva el uso del biomodelo más sensible, así como la comparación de los valores de daño al ADN tras las administración oral del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* de forma reiterada en modelos murinos, contra los valores de referencia propios que se determinaron en esta investigación.

Problema

Existe la necesidad de determinar los valores de referencia para Cuba de las tasas de daño espontáneo e inducido al ADN mediante técnicas citogenéticas en especies murinas que se

desarrollan y comercializan por CENPALAB y que así, se cuente con los propios datos de referencia, para posteriormente comparar estas tasas de daño entre especies para determinar el biomodelo experimental más sensible, sobre la base del uso del modelo que presente menores índices espontáneos de daño al ADN y una respuesta aceptable a mutágenos químicos. A la par de esta problemática, es necesario priorizar investigaciones que permitan determinar con el uso del biomodelo más eficiente el diseño experimental más adecuado en los ensayos de antígenotoxicidad *in vivo*, para sentar las bases de posibles guías regulatorias para ensayos de este tipo y por último, es necesario llevar a la práctica los resultados de estas investigaciones básicas, al determinar las posibles potencialidades genotóxicas de un extracto natural con el uso del biomodelo más sensible.

Hipótesis

A partir de la comparación de la sensibilidad de biomodelos experimentales murinos en los ensayos de genotoxicidad y antígenotoxicidad empleando técnicas citogenéticas, es posible identificar el biomodelo más eficiente para este tipo de evaluación toxicológica.

Esta tesis recoge novedades científicas de tipo aporte al conocimiento y nuevas metodologías experimentales, pues los resultados de los índices espontáneos e inducidos en cuatro ensayos de genotoxicidad de diferentes líneas de ratones y de ratas se emplearán como valores de referencias en las investigaciones nacionales e internacionales. Además, permitió establecer la especie y línea más sensible para detectar el daño genotóxico, útil como estrategia en evaluaciones genotóxicas *in vivo*, permitiendo ampliar los niveles de seguridad para el humano asociado al consumo de un principio activo. La armonización de varios biomodelos experimentales en ensayos de antígenotoxicidad *in vivo*, permitirá establecer guías regulatorias para ensayos de este tipo y por último, el uso del biomodelo más sensible permitió definir posibles efectos genotóxicos *in vivo* al administrar por vía oral un extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet con potencialidades antioxidantes.

Su utilidad económica y social se sustenta en el hecho de que al obtener una buena caracterización desde el punto de vista del daño endógeno al ADN por varios mecanismos de genotoxicidad, permitirá determinar con menor margen de error la seguridad de productos farmacéuticos, todo esto redundará en la mejora de la calidad de vida de la población. Aumentará el mayor conocimiento de estos biomodelos, que se traduce en un aumento del interés de centros de

investigación-desarrollo de la industria biotecnológica-farmacéutica de otros países, en comercializar estos modelos experimentales y por último los diseños experimentales de antigenotoxicidad permitirán la evaluación de nuevos principios activos con potencialidades antigenotóxicas, útiles en terapias combinadas con fármacos citostáticos para pacientes con cáncer.

Este trabajo consta de 8 capítulos distribuidos de la siguiente forma: Una Introducción que incluye de forma breve una panorámica sobre el tema y la problemática a resolver (5 páginas). Posteriormente la Revisión Bibliográfica en la cual se hace un análisis actualizado de los principales ensayos de genotoxicidad y las principales problemáticas (29 páginas). En Materiales y Métodos se explican y resumen las metodologías utilizadas y el diseño experimental (10 páginas), mientras que en los Resultados y Discusión se presentan de acuerdo a su diseño los resultados más relevantes y su discusión crítica respecto a la literatura (45 páginas). Por último se exponen Conclusiones y Recomendaciones (1 página de forma separada en cada una) y se relacionan las Referencias Bibliográficas utilizadas (19 páginas). Además, se muestra la síntesis del trabajo y el índice con los epígrafes y subepígrafes de la tesis. El documento también contiene una relación de las abreviaturas empleadas. Las tablas y gráficos se muestran sin número en sus páginas, incluidos dentro del texto donde se hace referencia a ellos, para facilitar la comprensión de la presentación y discusión de los resultados. Al final se muestran los anexos y por último los avales de la tesis sin número en las páginas.

Objetivo General

Comparar la sensibilidad de diferentes biomodelos murinos en ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad.

Objetivos Específicos

1. Comparar el daño genotóxico espontáneo e inducido a diferentes niveles de expresión en el ADN entre varias líneas de ratón y de rata.
2. Evaluar el efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en diferentes diseños experimentales en la línea de ratón y de rata seleccionada como biomodelos de antigenotoxicidad.
3. Evaluar el efecto genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet a diferentes niveles de expresión de daño al ADN al utilizar la línea murina más sensible.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fuentes de exposición de los seres vivos a las sustancias tóxicas ambientales

La exposición a los agentes tóxicos se presentan en forma aguda, en un solo episodio generalmente accidental, cuando ingresan al organismo cantidades elevadas de algún tóxico. Puede darse en forma crónica, si existe exposición continua a dosis bajas, que suele ir acompañada de su acumulación en el organismo, produciéndose la respuesta tóxica después de mucho tiempo (Limón y col., 2013).

La ruta o forma de ingreso al organismo es también variada: puede ser por inhalación, por vía digestiva o por contacto a través de la piel. Las poblaciones de organismos pueden estar expuestas a los tóxicos de manera 1) involuntaria, como ocurre en el ambiente abierto, 2) voluntaria, cuando el individuo emplea fármacos o agentes terapéuticos, y 3) ocupacional, en el ambiente de trabajo (Limón y col., 2013). La concentración de las sustancias químicas en el cuerpo puede medirse al analizar la sangre, la orina y el pelo.

Los procesos que controlan el destino final de un compuesto químico en el ambiente son el transporte, la transformación y la transferencia del mismo. El transporte o movimiento de los agentes químicos en el ambiente se debe fundamentalmente a las fuerzas naturales, como el viento o el agua, cuya dirección y velocidad determinarán su concentración (Gilden y col., 2010). La transformación es un cambio en la estructura física o química de un compuesto. Un compuesto químico puede pasar de sólido a líquido y de éste a gas, o transformarse por reacciones químicas como la oxidación y la reducción, procesos que se llevan a cabo en los organismos (Miller, 2004). Esto los puede activar o degradar. La transformación también se refiere a las interacciones de diversos agentes químicos en el ambiente y a las reacciones que bajo ciertas condiciones se realizan entre ellos (Gilden y col., 2010).

La transferencia es el movimiento de los compuestos químicos en la biosfera: aire, agua, suelo y organismos vivos. Así, un agente químico presente en el agua puede volatilizarse, pasando al aire, transferirse al suelo por acción de la lluvia y de allí incorporarse a la cadena alimenticia (Gilden y col., 2010). El resultado neto de estas transferencias es una amplia distribución de sustancias tóxicas en el medio ambiente, y por lo tanto, el aumento del riesgo de exposición (Roldan y col., 2008).

El comportamiento y destino final de muchos agentes químicos está influenciado por diferentes aspectos tales como la solubilidad en agua, la presión de vapor, la bioconcentración y la biotransferencia (Roldan y col., 2008).

En general, los agentes químicos que son solubles en agua son menos peligrosos que los insolubles, lo que se debe a que suelen ser menos volátiles, más móviles y biodegradables (Roldan y col., 2008). La presión de vapor es un factor importante que mide la volatilidad de un agente químico en estado puro, y es un indicador del grado de transporte del compuesto químico en el aire, siendo éste el medio más importante para su distribución (Roldan y col., 2008). Es importante determinar el destino final de un compuesto químico en los seres vivos, ya que muchos son capaces de concentrar en sus órganos y tejidos cantidades elevadas de una sustancia, como ocurre con los peces y el ganado (Jonson y col., 1997). En estos casos, la cadena alimenticia se convierte en una fuente importante de exposición a agentes químicos (Jonson y col., 1997).

2.2. ¿Cómo responden los organismos ante los agentes tóxicos?

La respuesta de los organismos ante un tóxico depende de varios factores, siendo los más importantes, las propiedades específicas, físicas y químicas del compuesto y la cantidad a la que estén expuestos (Jonson y col., 1997). La relación dosis-respuesta es un criterio que suele establecerse con los organismos a emplear en el ensayo. Aunque no brinda información acerca de los mecanismos de acción propios del agente, sí permite establecer en términos prácticos y cuantitativos cuán tóxico es (Adams y Lambert, 2006; Teitelbaum, 2009). El tipo de respuesta que se establece es un índice de letalidad en función del número de individuos tratados que mueren. La dosis letal también permite conocer la potencia del compuesto por la magnitud de la respuesta del organismo (Jonson y col., 1997; Adams y Lambert, 2006).

2.3. Movimiento de los agentes tóxicos en el organismo

Cuando las sustancias tóxicas ingresan al organismo, interaccionan en el nivel celular con un receptor específico, que suele ser una proteína (Guyton y Hall., 2011). Cuando la concentración de la sustancia dentro de la célula es grande, los sitios receptores se saturan y se produce una respuesta tóxica máxima; cuando la concentración es baja, la respuesta es menor (Teitelbaum, 2009). Esta relación permite establecer a los toxicólogos qué dosis produce el efecto que se desea evidenciar sin ser tóxica, para fines terapéuticos (Repetto y Repetto, 2009).

Para que una sustancia tóxica ejerza sus efectos en un ser vivo debe ponerse en contacto con el organismo. La piel en los animales y la corteza en las plantas son las barreras naturales que separan a los organismos del medio ambiente (Guyton y Hall., 2011). Sin embargo, una vez que ingresa una toxina al organismo, por cualquier ruta, ésta se absorbe y distribuye por el torrente circulatorio hasta llegar a las células blanco, que son las que tienen los receptores para un compuesto químico específico (Repetto y Repetto, 2009). Los agentes tóxicos se eliminan de la circulación al ser excretados por el riñón, o acumularse en los tejidos grasos, o bien biotransformarse en las células del hígado y otros órganos (Guyton y Hall, 2011).

En el organismo existen barreras naturales, las membranas de las células, a través de las cuales el agente tóxico debe pasar. Estas membranas tienen estructuras muy variadas y por lo tanto funciones diversas (Repetto y Repetto, 2009). Fundamentalmente, se forman por fosfolípidos y proteínas, los primeros arreglados en una bicapa y las proteínas que se esparcen entre ellos. Las membranas tienen poros a través de los cuales las células se ponen en contacto con el exterior (Teitelbaum, 2009). Las proteínas les confieren a las membranas una especificidad en cuanto al transporte o ingreso a la célula de los compuestos químicos. Los fosfolípidos, que están formados por ácidos grasos, si son saturados, es decir, sin dobles enlaces entre sus carbonos, hacen a la membrana menos franqueable. Si hay mayor cantidad de ácidos grasos insaturados la membrana permite más fácilmente el paso de sustancias (Guyton y Hall, 2011).

Los mecanismos mediante los cuales un compuesto químico pasa a través de una membrana pueden ser pasivos, es decir, la membrana no participa activamente en el proceso, como ocurre en la difusión del alcohol etílico, por ejemplo, que depende de la solubilidad en los lípidos de la membrana (Repetto y Repetto, 2009). El compuesto puede penetrar por filtración, cuando tiene un tamaño lo suficientemente pequeño como para atravesar los poros de la membrana (Guyton y Hall, 2011).

Cuando el compuesto químico es insoluble en los lípidos de la membrana, cuando las moléculas de la sustancia son muy grandes y no pueden atravesar los poros y canales de la membrana, o cuando se trata de sustancias ionizadas, se establece entonces el llamado transporte activo (Repetto y Repetto, 2009). Este es selectivo en principio, ya que depende de la estructura química del compuesto, de una molécula transportadora específica de membrana, y de un gasto de energía adicional por parte de la célula (Teitelbaum, 2009). Esto se debe a que ingresa en contra de un

gradiente de concentración, en competencia con los nutrientes que normalmente ingresan a las células por este mecanismo (Guyton y Hall, 2011).

Las sustancias químicas que se transportan activamente a través de las membranas pasan al interior de las células en forma de un complejo. En el interior de la célula éste se disocia, y la molécula transportadora regresa nuevamente a la superficie de la membrana, en lo que se puede repetir el proceso (Cameán y Repetto, 2007; Teitelbaum, 2009).

Los agentes tóxicos atraviesan las membranas de las células e ingresan al torrente sanguíneo de la misma manera que el oxígeno que se inhala llega a los pulmones, y los nutrientes que se ingieren oralmente pasan al tracto digestivo (Cameán y Repetto, 2007; Teitelbaum, 2009).

La distribución del agente tóxico en el organismo depende de las características fisicoquímicas del compuesto, de su capacidad para atravesar membranas y de su afinidad por los componentes normales del organismo (Guyton y Hall, 2011). Una vez en el torrente sanguíneo, los agentes químicos suelen unirse a proteínas del plasma, lo cual les impide ingresar a las células por difusión (Teitelbaum, 2009). Sin embargo, esta interacción muchas veces desplaza a la sustancia química que ya estaba unida, de manera que las toxinas suelen estar en equilibrio en el plasma, es decir, tanto en forma unida como en forma libre (Cameán y Repetto, 2007).

En los animales existen órganos que tienen una gran capacidad para concentrar agentes tóxicos, como el hígado y los riñones (Cameán y Repetto, 2007). En el hígado existen numerosas proteínas que transportan activamente diferentes compuestos extraños o xenobióticos (Guyton y Hall, 2011). En el interior de las células hepáticas se lleva a cabo la transformación de los compuestos, o metabolismo, sea para hacerlos más solubles y dejarlos listos para excretarse por los riñones, o bien para activarlos formándose un compuesto muy reactivo (Teitelbaum, 2009). Ya que el metabolismo desempeña en las células un papel dual de desintoxicación-eliminación y activación-toxificación (Guyton y Hall, 2011).

A medida que el organismo metaboliza y elimina toxinas, se van liberando de los sitios de depósito hacia el plasma, de ahí pasan al hígado, y el ciclo se repite. Este proceso es importante, ya que muchas toxinas liposolubles se acumulan y ejercen sus efectos adversos durante mucho tiempo, como ocurre con los anestésicos, los barbitúricos y los pesticidas (Repetto y Repetto, 2009).

La eliminación de los agentes tóxicos del organismo es un factor importante en relación con los

efectos biológicos (Teitelbaum, 2009). Lógicamente, la eliminación rápida reduce los riesgos, y en muchos casos la toxicidad y los daños al organismo no se presentan. La ruta más importante de eliminación es el riñón. Esta se realiza en las células renales por difusión, filtración o por transporte activo (Guyton y Hall, 2011).

Los compuestos liposolubles no polares, es decir sin carga, suelen ser reabsorbidos por difusión y regresan al torrente sanguíneo, mientras que los compuestos polares y los iones son excretados activamente (Repetto y Repetto, 2009). Los iones negativos, o aniones, se excretan más fácilmente cuando la orina es ácida, y los iones positivos, o cationes, cuando la orina es básica (Teitelbaum, 2009).

Los seres vivos tienen la capacidad de degradar y eliminar muchos compuestos extraños. Sin embargo, cuando la absorción es mayor que la excreción, el agente químico tiende a acumularse en cantidades elevadas, y mostrar un efecto tóxico (Singh, 2006).

2.4. El metabolismo de las sustancias tóxicas

Las toxinas se metabolizan desde que las primeras células se formaron, de manera que los mecanismos de desintoxicación han estado siempre presentes en los seres vivos (Repetto y Repetto, 2009). El agua y el alimento no tratado, así como el aire, contienen muchas sustancias que no son necesarias para la vida y que pueden ser tóxicas; aún el oxígeno en cantidades elevadas es tóxico (Singh, 2006).

La estructura química de los compuestos nutritivos naturales y de los metabolitos intermedios es muy variada, de modo que la maquinaria celular está provista de numerosos catalizadores, o enzimas, que hacen frente a esta gran diversidad de productos químicos de la dieta (Tetko y col., 2006; Teitelbaum, 2009). Este conjunto de enzimas también lo emplea la célula para eliminar compuestos tóxicos potencialmente nocivos. La capacidad de desintoxicación celular tiene un límite que está dado por la dosis de la sustancia (Repetto y Repetto, 2009).

Después de que un agente xenobiótico se absorbe por el organismo, éste se biotransforma. Por lo general los productos del metabolismo son más solubles en agua, lo que facilita su eliminación y hace desaparecer su toxicidad; en otras ocasiones se obtiene una sustancia como producto intermedio del metabolismo, la cual es más reactiva que la original, y que puede reaccionar con otras macromoléculas celulares (Tetko y col., 2006).

Las enzimas que realizan las reacciones químicas relacionadas con la biotransformación se

encuentran en el citoesqueleto, en el retículo endoplásmico, en los organelos llamados mitocondrias, y en el caso de los mamíferos, en las células hepáticas (Andrade y col., 2007; Teitelbaum, 2009). Estas reacciones producen metabolitos estables nucleofílicos más solubles en agua, por lo que algunas reacciones se realizan en presencia de este líquido, lo cual recibe el nombre de hidrólisis. Otras se realizan en presencia de oxígeno (oxidación), y algunas más por hidrógeno (reducción) (Andrade y col., 2007). En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos.

Si el compuesto tiene un grupo funcional, es decir grupos de átomos unidos a la cadena de carbono, éste puede combinarse con enzimas en el fenómeno llamado conjugación, y así se produce un compuesto polar, soluble en agua, que se elimina tal como se muestra en la Figura 2 (Repetto y Repetto, 2009).

Las enzimas que intervienen en la bioactivación de los agentes xenobióticos realizan esencialmente las mismas funciones generales (Andrade y col., 2007). El producto intermedio del metabolismo resulta ser iónico, y potencialmente muy reactivo, lo que puede producir daño a los tejidos, despertar reacciones inmunológicas o interactuar con los ácidos nucleicos (Repetto y Repetto, 2009).

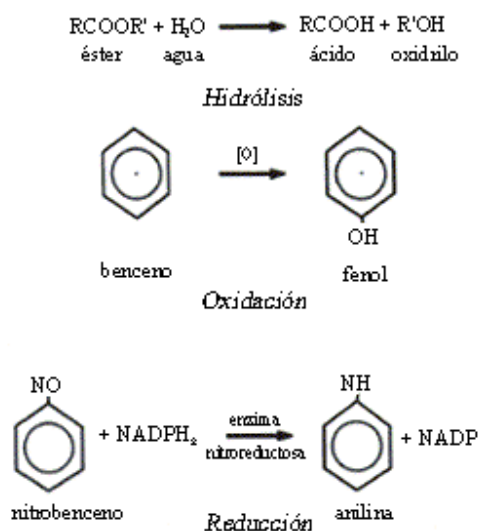


Figura 1. Ejemplos de reacciones metabólicas. R y R' =radicales (excepto hidrógeno).



Figura 2. Conjugación.

2.5. Evaluaciones toxicológicas. Consideraciones generales

La toxicología se define como el estudio de los efectos adversos de agentes químicos, físicos o biológicos en organismos vivos y ecosistemas y se basa en el principio del siglo XVI que cualquier sustancia puede ser tóxica si se consume en cantidad suficiente (Repetto y Repetto, 2009).

La mayoría de los países desarrollados, crearon leyes y regulaciones para controlar el proceso de producción y distribución de medicinas, vacunas, aditivos alimentarios, pesticidas, productos químicos industriales y otras sustancias con potencial toxicológico (Teitelbaum, 2009; Silbergeld, 2012). Tales regulaciones casi siempre prescriben un régimen de evaluación toxicológica para generar información que les permita a los toxicólogos determinar si los beneficios de una sustancia particular sobrepasan sus riesgos a la salud humana y al medio ambiente. El proceso de evaluación regulatoria del riesgo puede ser dividido en 3 fases (Teitelbaum, 2009; Repetto y Repetto, 2009):

- 1) Identificación del peligro: Determinación de la toxicidad intrínseca de la sustancia (irritación ocular, defectos al nacer o cáncer) a través del uso de pruebas de toxicidad. Los resultados de las pruebas se analizan para determinar, si existe alguno, cual efecto adverso ocurre bajo distintos niveles de exposición (se conoce como dosis respuesta) y, donde sea posible, identificar el nivel mínimo de exposición al cual no se observan efectos adversos (conocido como nivel de efectos adversos no observados o NOAEL) (Shayne, 2007; Silbergeld, 2012).
- 2) Estimación de la vulnerabilidad: Determinación del grado de exposición humano o medioambiental ha determinado agente, que incluye la exposición de poblaciones específicas, su composición, tamaño y los tipos. Además la magnitud, frecuencia y duración a estas exposiciones (Repetto y Repetto, 2009).
- 3) Caracterización del riesgo: Análisis compositivo del peligro y de resultados de la estimación

de la vulnerabilidad para obtener un estimado real de riesgo ecológico y para la salud (Repetto y Repetto, 2009).

Para ello se evalúan los fármacos en ensayos de una sola exposición o toxicidad aguda, a dosis repetidas que van desde la exposición de 28 días hasta 1 año en roedores, ensayos de genotoxicidad que incluye estudios *in vitro* e *in vivo*, toxicología de la reproducción y por último los ensayos de carcinogenicidad. Además, se incluyen nuevos ensayos de toxicología especial, los cuales se utilizan en dependencia del efecto farmacológico del principio activo que se investiga (Gámez y Más, 2007).

2.6. Toxicología genética

La genética toxicológica tiene sus inicios en el año 1927, cuando Mueller demuestra la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila melanogaster* (Shayne, 2007). Años más tarde, en 1949, Auebach descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, descubrimiento que permitió incrementar el concepto de mutagénesis (Shayne, 2007).

Durante las décadas del 50 y 60 del siglo pasado se alcanzan la mayor parte de los conocimientos básicos acerca de la estructura y replicación del ADN, código genético, los mecanismos de la síntesis proteica y la reparación del ADN (Shayne, 2007). No en vano, esta época se describe como la edad de oro de la Genética Molecular (Shayne, 2007).

La Sociedad de Mutagénesis Ambiental se funda en 1969, esto se debe a la preocupación de muchos investigadores por el impacto genético que podría acarrear la proliferación de contaminantes químicos en el ambiente, producto de la actividad humana. En este mismo año se reconoce a la Toxicología Genética, como disciplina científica. Décadas más tarde, el desarrollo de la denominada tecnología del ADN recombinante ofreció metodologías que resultan fundamentales en el conocimiento directo de la estructura y configuración del genoma, la identificación de genes específicos, la determinación de las alteraciones que se generan en la información genética y su relación con la inducción del cáncer y otras enfermedades de base genética (Angerer y col., 2007; Silbergeld, 2012).

Las investigaciones que se relacionan 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 (Angerer y col., 2007; Azqueta y col., 2009; Lamadrid y col., 2011). 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 las enfermedades genéticas en futuras generaciones (Repetto y Repetto, 2009; Speit y col., 2009). Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas (Giri y col., 2002). Tercero, el origen ambiental del cáncer (Shayne, 2007; Limón y col., 2013).

La gran cantidad de nuevos productos que ingresan al mercado dificulta su total evaluación al emplear ensayos en roedores, por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo, los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre (Gámez y Más, 2007; OECD, 2009; Silbergeld, 2012). En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos (OECD, 2009; Silbergeld, 2012). Se proponen más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se obtiene mucha información importante (Silbergeld, 2012).

2.7. Efectos adversos de las mutaciones

Las mutaciones se producen tanto en las células germinales como en las células somáticas (Sudhir y Sankar, 2002). Las consecuencias de una y otra son distintas, en términos de la población y del individuo. Los cambios que se generan en los gametos provocan esterilidad en el individuo portador o bien fijarse en el material genético, lo cual se traduce en cambios heredables (mutagénesis) (Croce, 2008).

Si las mutaciones se producen en células somáticas el individuo puede desarrollar enfermedades, o bien iniciar el proceso canceroso (carcinogénesis) (Sudhir y Sankar, 2002; Croce, 2008). Los cambios genéticos también pueden provocar durante el desarrollo embrionario alteraciones en el embrión, proceso que se conoce como teratogénesis (Figura 3).



Figura 3. Efectos adversos de las mutaciones.

2.8. Los agentes genotóxicos y el daño genético

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos (Negrini y col., 2007). Durante el proceso, el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas (Troyer, 2009). Una vez dentro de la célula, el agente químico puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se llama promutágeno. Se da entonces la interacción con el ADN, que puede ser reparada eficiente o ineficientemente, de manera tal, que el daño genético inicial se fijará o no, expresándose en las diferentes estirpes celulares (Griffiths y col., 2008; Troyer, 2009), tal como se muestra en el esquema de la Figura 4.

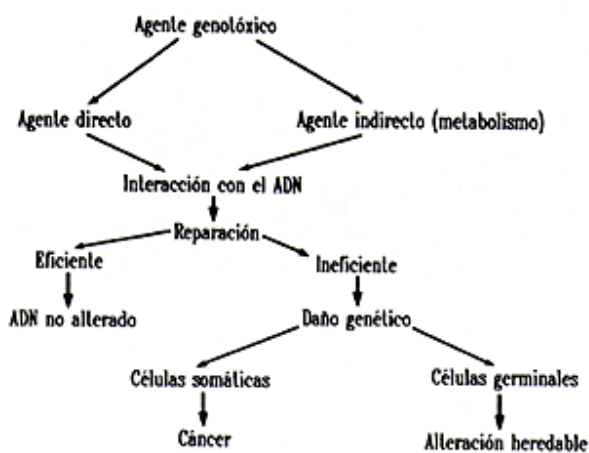


Figura 4. Los agentes genotóxicos y el daño genético inducido.

2.9. Metabolismo de los agentes genotóxicos

En realidad, la gran mayoría de los agentes genotóxicos son inertes en los seres vivos. Es a través de las enzimas metabólicas que las genotoxinas se biotransforman a productos más reactivos, o electrofílicos, capaces de interactuar con diversas macromoléculas celulares, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos (Klug y col., 2006; Brown, 2008).

Los procariontes son incapaces de bioactivar promutágenos, y entre los eucariontes existen diferencias importantes en cuanto a la capacidad metabólica; ya que cada especie desplegó durante la evolución un grupo particular de enzimas para neutralizar los efectos nocivos de las toxinas naturales de origen vegetal. De hecho, las enzimas metabólicas muestran diferencias considerables en los diferentes órganos del individuo, entre los individuos de la misma especie y entre las diferentes especies. La actividad enzimática varía en el individuo y depende de la edad, el sexo, factores nutricionales, niveles hormonales y otros factores biológicos (Klug y col., 2006; Brown, 2008; Lewin, 2008).

En principio, el conjunto de enzimas de los eucariontes hidroliza, oxida y reduce compuestos extraños, reacciones que se llevan a cabo en el sistema de citocromos P-450 que se encuentran en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico de las células con núcleo (Donato, 2006). Los productos intermedios que se generan en ocasiones se conjugan con proteínas, y forman compuestos altamente reactivos (Fojjer y Te Riele, 2006). En las células eucariotas existen numerosas enzimas que activan a los promutágenos, pero también otras enzimas que desintoxican e inactivan a los productos intermedios; el equilibrio entre estas dos funciones celulares es el que en última instancia determina el potencial genotóxico del promutágeno (compuesto químico inerte que requiere ser metabolizado, transformándose así en un compuesto electrofílico y por lo tanto reactivo) (Tirunilai, 2012; Stuart, 2013).

En la Figura 5 se muestra la activación inicial de algunos promutágenos. Muchos de ellos pasan por diversos procesos metabólicos, que generan varios productos intermedios. El compuesto electrofílico terminal es el que va a interactuar con los átomos nucleofílicos del ADN (los sitios nucleofílicos de las bases nitrogenadas son los centros que pueden ser atacados por moléculas electrofílicas, por ejemplo el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina) (Repetto y Repetto, 2009).

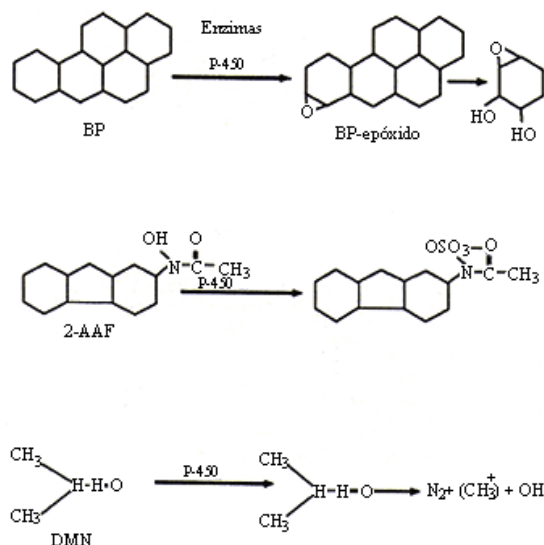


Figura 5. Activación metabólica de algunos promutágenos.

Es importante mencionar que existen también compuestos químicos que no son carcinógenos, pero que potencian el efecto de carcinógenos. Estos agentes químicos se llaman cocarcinógenos y suelen actuar en la etapa de promoción tumoral (Tirunilai, 2012; Stuart, 2013).

2.10. Interacciones con el ADN

Los productos reactivos que se generan a través del metabolismo interactúan con el ácido desoxirribonucleico, produciéndose lesiones premutagénicas, o aductos, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones puntuales en el ADN (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Dricu, 2012; Cooper y Chen, 2012; Gowder, 2012), tales como sustituciones de bases, transiciones y transversiones, o bien mutaciones de corrimiento de marco de lectura (Tirunilai, 2012; Amr El-Missiry, 2012; Mishra, 2012).

Sin embargo, en muchos casos, las lesiones premutagénicas son eficientemente reparadas por enzimas que funcionan en los organismos para mantener la integridad y fidelidad de los ácidos nucleicos. Se piensa que las enzimas que intervienen en los procesos de reparación aparecieron pronto en la evolución, ya que están presentes en las bacterias (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Dricu, 2012; Cooper y Chen, 2012; Gowder, 2012).

Los mecanismos de reparación funcionan antes o después de la replicación del ADN. Su eficiencia varía, ya que pueden reparar eficientemente, es decir, sin errores, situación que se presenta cuando la exposición a agentes genotóxicos es baja; o bien reparar de manera

ineficiente, promoviendo errores en el ADN, lo que depende de la saturación del primer mecanismo y que generalmente ocurre cuando hay exposiciones altas (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Dricu, 2012; Cooper y Chen, 2012; Gowder, 2012).

Sin embargo, ambos mecanismos se afectan por numerosas variables además de la exposición. Dependen también de la estructura química del mutágeno, del tipo de aducto formado y de la cantidad de daño que se indujo (Amr El-Missiry, 2012; Mishra, 2012).

2.11. Los compuestos químicos genotóxicos

A partir de la Revolución Industrial del siglo XVIII se comenzó a producir en grandes volúmenes no sólo maquinaria, sino diversos productos químicos, de manera tal que hoy día se calcula que la industria genera alrededor de 100 000 productos que se utilizan ampliamente, y que ingresan al mercado cada año cerca de 2 000 productos nuevos (Amr El-Missiry, 2012; Mishra, 2012). Muchas de estas sustancias tienen un potencial reactivo al ponerse en contacto con los seres vivos.

Desde el punto de vista genotóxico se valoran alrededor de 10 000 sustancias químicas y los resultados indican que cerca de 1 000 son genotóxicas. También se identifican entre estos agentes químicos a grupos capaces de interactuar en las células con macromoléculas vitales, entre los que se incluyen a los pesticidas, los metales, los aditivos de alimentos y los derivados de la combustión incompleta de productos energéticos, como el carbón y las gasolinas (Amr El-Missiry, 2012; Mishra, 2012).

En el caso en particular de los metales se destaca el cromo, siendo un metal esencial en cantidades muy pequeñas para los seres vivos; en el organismo se transforma de cromo VI a cromo III. En cantidades elevadas este metal interactúa con los ácidos nucleicos y produce micro y macrolesiones, sarcomas, carcinomas y adenocarcinomas (Amr El-Missiry, 2012; Mishra, 2012).

El plomo es un metal que se encuentra en la atmósfera en cantidades elevadas, sobre todo en zonas urbanas. En forma orgánica, como el tetraetilo de plomo, se utiliza como antidetonante para las gasolinas en los vehículos de combustión interna. El metal interfiere con la biosíntesis del grupo hemo de las hemoglobinas, ya que compite con el hierro, que es el metal característico del grupo y se incorpora en su lugar (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Dricu, 2012; Cooper y Chen, 2012; Gowder, 2012).

El mercurio es eficientemente transformado en los seres vivos, y tiende a acumularse en la cadena alimenticia. Se conocen varios casos de intoxicación en humanos por metil-mercurio, debidos al consumo de pescados contaminados (Silbergeld, 2012). En la Tabla 1 se muestran los efectos genotóxicos de algunos metales pesados.

Tabla 1. Algunos metales pesados y sus efectos genotóxicos en los seres vivos.

<i>Metal</i>	<i>Efecto genotóxico</i>
Arsénico	Cáncer de piel, efectos sobre la reproducción, mutagénico.
Cadmio	Mutagénico, sarcomas.
Cromo	Cáncer pulmonar, mutagénico.
Níquel	Carcinoma nasal, mutagénico.
Plomo	Anemia, linfomas, carcinomas y sarcomas renales, mutagénico.

El alimento que a diario se consume es una mezcla compleja de sustancias, donde coexisten mutágenos y antimutágenos, de origen tanto natural como artificial (residuos de pesticidas), así como algunos otros compuestos que se añaden intencionalmente con el propósito de conservar el alimento, y que en principio no tienen valor nutritivo (Silbergeld, 2012).

Por lo general, los aditivos de alimentos no representan un grupo de sustancias que provoquen daños mayores que los productos naturales encontrados en los alimentos. Si bien es cierto que debe probarse su toxicidad antes de exponer a los seres humanos a ellos, también se conoce que es muy difícil reproducir con animales de laboratorio condiciones tales como dosis, tiempo de exposición y consumo a los que el hombre se somete (Silbergeld, 2012).

2.12. Los productos naturales (mezclas complejas)

La gran variedad de carcinógenos naturales o sintéticos que existen en el ambiente se encuentran formando mezclas complejas (Cameán y Repetto, 2007; Repetto y Repetto, 2009; Mishra, 2012; Limón y col., 2013). La producción y uso de compuestos orgánicos sintéticos tales como los plásticos, fármacos y pesticidas, así como la producción y uso de fuentes variadas de energía y la movilización de sustancias naturales generan problemas que hoy día se consideran globales. A esto se suma el calentamiento de la Tierra, efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono, la lluvia ácida, la desertificación de los pulmones naturales, y por último, la distribución ubicua de compuestos carcinogénicos (Repetto y Repetto, 2009; Mishra, 2012).

En las mezclas complejas, los compuestos químicos pueden interactuar por suma, generándose una potenciación, o bien de forma antagónica, la que se traduce en una disminución o cancelación total de efecto (Repetto y Repetto, 2009; Mishra, 2012).

Los efectos biológicos y genéticos de los carcinógenos se determinan en el laboratorio al emplear organismos de prueba, pero aún se desconocen las consecuencias que a largo plazo puedan producir en los seres humanos los compuestos químicos y sus mezclas presentes en la biosfera (Andrade y col., 2007; Repetto y Repetto, 2009; Mishra, 2012).

2.13. Ensayos de genotoxicidad. Generalidades

Con la excepción de algunos virus, el material genético de todos los organismos es el ácido desoxirribonucleico, el cual se presenta en forma desnuda (procariontes) o asociado a proteínas (eucariontes). Las mutaciones son eventos que en principio pueden detectarse en todos los organismos (Mishra, 2012). El significado de una respuesta mutacional es más evidente en los organismos cuya genética se conoce extensivamente, ya que la respuesta puede representar uno o varios tipos de alteraciones genéticas (Mishra, 2012).

La mutación es por lo tanto un error y consiste en diferentes tipos de cambios del material genético. La severidad de la mutación dependerá tanto de la importancia del gen alterado como de la naturaleza misma de la mutación. Por lo tanto, los diferentes sistemas de prueba deben detectar todo tipo de mutaciones, incluyendo aquellas que tienen efectos menores sobre la función génica (Tornaletti y Pfeiffer, 1996; Mishra, 2012).

Los tipos de mutaciones que requieren ser detectadas, aunque no necesariamente de manera simultánea son:

1) Las mutaciones génicas, como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Las adiciones y supresiones pueden inactivar a un gen, lo que dependerá de la naturaleza misma del gen que se trata. Sin embargo, este tipo de alteraciones permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se establecen y se heredan a las siguientes generaciones (Tornaletti y Pfeiffer, 1996; Mishra, 2012).

2) Las alteraciones en la integridad del ADN. Éstas se miden a través de la formación de aductos (lesiones premutagénicas), ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden repararse enzimáticamente, y si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Cooper y Chen 2012;

Mishra, 2012).

3) Los cambios en la segregación cromosómica, lo que provoca cambios numéricos que comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Cooper y Chen 2012; Mishra, 2012).

4) Los cambios en la integridad cromosómica o estructural, que consisten en supresiones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Las supresiones pequeñas, en condición homocigótica (alelos idénticos), y las grandes, en condición heterocigótica (alelos distintos), son deletéreas y provocan desde el desarrollo de enfermedades genéticas en los individuos afectados hasta letalidad (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Cooper y Chen 2012; Mishra, 2012). Los rearrreglos estructurales pueden detectarse citológicamente, ya que comprenden porciones grandes de los cromosomas, y en organismos de bioensayo adecuados pueden detectarse cambios en las relaciones de ligamiento (Thirumulu y Ikehara, 2011; Tirunilai, 2012; Cooper y Chen 2012; Mishra, 2012).

De los sistemas a pruebas más comúnmente empleados se encuentran los que detectan mutaciones, rompimientos cromosómicos (clastogenia) y recombinación mitótica (recombinación en células somáticas), por varias razones: detección de mutaciones en células germinales, predicción de la carcinogénesis, investigación de las propiedades bioquímicas de los compuestos y para cumplir con los reglamentos de los organismos reguladores (OECD, 2009). Estos sistemas son:

- 1) Microorganismos. Detecta alteraciones heredables.
- 2) Prueba microsomal. Tecnología *in vitro* que permite la activación de promutágenos en presencia de organismos indicadores (como *Salmonella*).
- 3) Prueba de micronúcleos. Los fragmentos cromosómicos o cromosomas con centrómero inactivado no se incorporan a las células hijas (OECD, 1997; Jia, 2003; LeBaron y col., 2013).
- 4) Prueba del *locis* específico. Método para detectar y medir las proporciones de mutación en un locus recesivo.
- 5) Daño al ADN. Detecta rompimientos en una hebra, ligamientos cruzados inter o intrabanda, y otros (Azqueta y col., 2009; Lamadrid y col., 2011; Carvalho y col., 2011).
- 6) Reparación del ADN. Rastrea la reparación del ADN.

- 7) Síntesis no programada de ADN. Detecta la síntesis de ADN durante fases no sintéticas.
- 8) Inhibición del ADN. Detecta la inhibición en la síntesis del ADN.
- 9) Conversión génica. Se recobran marcadores desiguales que resultan del intercambio durante la recombinación.
- 10) Recombinación mitótica. Pérdida de la heterocigosis y recombinación intragénica (dentro del gen).
- 11) Análisis citogenético. Células o líneas celulares en cultivo para determinar aberraciones cromosómicas (Gámez y col., 2010; Gámez y col., 2012).
- 12) Intercambio de cromátidas hermanas. Detecta el intercambio de ADN en cromosomas en metafase entre los productos de réplica en *loci* homólogos.
- 13) Pérdida de cromosomas y no disyunción. Mide la falta de separación de cromosomas durante la mitosis o la meiosis (OECD, 1997a; 2009).
- 14) Mutaciones en células somáticas de mamíferos. Utiliza la inducción y aislamiento de genes en células de mamíferos en cultivo, identificando los cambios genéticos.
- 15) Prueba de letales dominantes. Mide los cambios genéticos inducidos de manera dominante, que matan al cigoto. En mamíferos, la reducción en el tamaño de la camada, al medir y contar el número de implantes que sobreviven (Hernández y Rosario, 2010).
- 16) Prueba vía el hospedero. Usa dos especies diferentes, como mamíferos y bacterias, para detectar cambios heredables que se establecen por la conversión metabólica de los agentes químicos que se administran en una especie huésped de mamífero.
- 17) Morfología del esperma. Apariencia anormal del esperma (Wyrobek y Bruce, 1975; Obidike y col., 2007; Domínguez y col., 2009).
- 18) Prueba de translocaciones heredables. Transmisión de una translocación de una generación a la siguiente.
- 19) Transformación oncogénica. Utiliza criterios morfológicos para detectar diferencias citológicas entre células normales y tumorales.
- 20) Capacidad inhibidora de los fagos. Emplea una bacteria lisogénica (bacteria que lleva un fago temperado) para detectar cambios en las características genéticas de no infecciosos a infecciosos.
- 21) Análisis de fluidos corporales. Usa dos especies; la sustancia se administra al hospedero, del cual se toma y se prueba *in vitro*, midiéndose la tasa de mutación en la especie receptora.

2.14. Estrategias regulatorias para ensayos de genotoxicidad

Los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando se conoce la toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías, la que se propone para su uso en humanos y otra que por lo general es la vía intraperitoneal (Gámez y Más, 2007). Las autoridades regulatorias como la Conferencia Internacional sobre la Armonización (ICH), Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y la Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos (EPA), exigen un ensayo *in vitro* que determine daño a nivel de genes, de elección el ensayo de Ames, y un ensayo *in vivo* que determine daño a nivel de los cromosomas, de elección el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones para realizar la solicitud de ensayo clínico fase I, en voluntarios sanos (OECD, 1997; 2009).

En los fármacos que se van a administrar por largos periodos de tiempo en el humano sea de forma preventiva o terapéutica, se deben realizar estudios de carcinogénesis y al estar estrechamente relacionados estos dos tipos de evaluaciones, ya que por lo general, la mayoría de las sustancias que son genotóxicas constituyen una fuente importante de sustancias cancerígenas, es necesario que se determine el daño a todos los niveles de organización del material genético (Gámez y Más, 2007; Mishra, 2012).

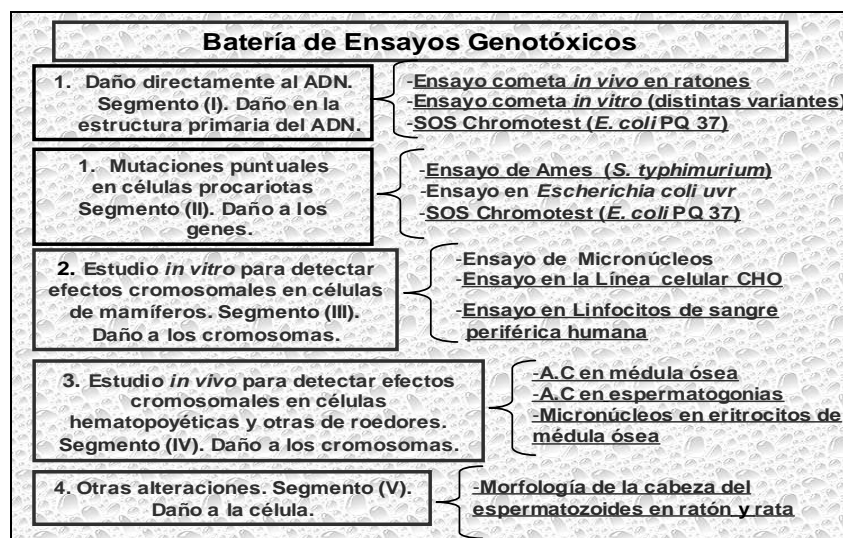


Figura 6. Batería de ensayos genotóxicos.

Existe una gama de ensayos genotóxicos a utilizar de forma estratégica y sensata, lo más conveniente según las propiedades del producto a evaluar y las condiciones de equipamiento, las cuales incluye: personal calificado, materiales, medios, disponibilidad de equipamiento, experiencia en la técnica evaluativa y en la interpretación científica. De esta forma se podrá dar una explicación real y veraz a los resultados obtenidos. En la Figura 6 se muestran los ensayos que más se utilizan y el nivel de daño que determinan. Dado que la mayoría de estos ensayos son bastante caros, es conveniente elegir cual realizar.

2.14.1. Estudios mutagénicos y genotóxicos *in vitro* más utilizados

El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad, porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente (Gámez y col., 2010; 2012; Mishra, 2012).

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos es de carácter obligatorio a nivel internacional (OECD, 2009). La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo. El amplio espectro de mutaciones que pueden originarse no se abarca en un ensayo aislado y ofrecería un resultado poco preciso (Mishra, 2012). Resulta imprescindible usar un grupo de ensayos *in vitro* e *in vivo*, que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico de la sustancia de interés, para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una correcta extrapolación de los hallazgos detectados hacia los posibles efectos en el hombre (Gámez y Más, 2007; Croce, 2008; Mishra, 2012).

Entre estos ensayos se encuentra el de Ames el cual permite definir un daño existente o no a nivel de genes, se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura o por sustitución de pares de bases del ADN (Mosley y col., 2007). Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye al ensayo la fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema (Di Giorgio y col., 2011). Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina

son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina. Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (his-), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones que induce la muestra problema (Mosley y col., 2007; Di Giorgio y col., 2011).

Otro ensayo *in vitro* con gran éxito de uso es el ensayo de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana, el cual permite detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo, por lo que es capaz de determinar daño a nivel de cromosomas (Kramer, 2000; Gámez y col., 2010; 2012). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas (Kramer, 2000; OECD, 2009). La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas (Kramer, 2000; OECD, 2009). No obstante, el presente método no se validó para medir aberraciones de ese tipo ni se emplea habitualmente con ese fin. En este ensayo se emplean cultivos de líneas celulares establecidas, estirpes celulares o cultivos de células primarias (Chen y col., 2011). Las células se seleccionan sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad cariotípica, el número y la diversidad cromosómica y la frecuencia de las aberraciones cromosómicas espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos (Gámez y Más, 2007). Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca sino que se deban a cambios en el pH, la osmolaridad o altos grados de citotoxicidad (OECD, 2009).

2.14.2. Estudios genotóxicos *in vivo* más utilizados

Aún los ensayos *in vivo* son de gran utilidad y hasta el momento no se sustituyen por métodos alternativos en la toxicología experimental, no obstante se destaca el avance de técnicas que cada día van encaminadas a realizar un uso racional de los animales en las investigaciones, dentro de estas se destacan el principio de las “3R”, llamadas Refinamiento, Reducción y Reemplazo.

Dentro de los ensayos *in vivo* que más se utilizan se encuentra el ensayo cometa, el cual permite definir si una sustancia dada es capaz de alterar la estructura primaria en el ADN (Azqueta y col.,

2009), ensayo que aún no está validado pero se utiliza en este campo como primario y pivote. Otro ensayo *in vivo* y quizás el más clásico lo constituye el de micronúcleos en médula ósea donde se determina el daño a nivel de cromosomas (LeBaron y col., 2013). Además se utiliza el ensayo de aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de roedores; pero en poca medida por lo costoso que suelen ser los reactivos y las técnicas que son más especiales que el de micronúcleos. Por último, se utiliza el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide el daño a nivel celular. Este ensayo es necesario realizarlo en dos especies (OECD, 2009).

- Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica de roedores (Ensayo cometa)

Este ensayo permite detectar un daño existente o no en la estructura primaria del ADN, tanto en la variante *in vivo* como en la *in vitro*. Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN son parámetros que se utilizan ampliamente para la detección de genotoxicidad y se demostró sus implicaciones en enfermedades degenerativas y el cáncer. En 1988 Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para la detección de este tipo de daño proporcionando por primera vez, datos a nivel de célula individual siendo más rápido, sensible y económico, con respecto a otros estudios genotoxicológicos como: intercambio de cromátidas hermanas, elusión alcalina y el ensayo de micronúcleos (Lillford y col., 2010; Vasquez, 2010; Bowen y col., 2011).

El ensayo cometa *in vivo* consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras (Lillford y col., 2010; Vasquez, 2010; Bowen y col., 2011). A $\text{pH} > 13$ los sitios lábiles al álcalis (SLA) como los sitios apurínicos se transforman rápidamente a rupturas de simple cadena. El uso de este pH permite maximizar la expresión de los SLA a rupturas de simple cadena (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004). Seguidamente al someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, proceso durante el cual los fragmentos negativamente cargados de ADN (ADN dañado) o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo, donde se aprecia una estructura parecida a la de un cometa, al teñir el ADN luego de la electroforesis. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN

siendo los rompimientos de doble cadena los causantes de mayor frecuencia de migración del material genético. Las células controles tienen un bajo número de roturas, estas exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN. En dichas células el ADN tiene cierta migración (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004), encontrándose un 10% de este en la cola (Duez y col., 2003; Hartmann y col., 2003).

Para detectar y cuantificar el daño al ADN este puede ser teñido con diferentes agentes como el nitrato de plata, los agentes fluorescentes son los más comúnmente utilizados. La elección de uno u otro depende de las necesidades específicas de cada investigador (Duez y col., 2003; Hartmann y col., 2003).

- Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de roedores

El hallazgo de la presencia de micronúcleos en eritrocitos como medida para determinar sustancias que dañan el ADN vinculados a la genotoxicidad fue desarrollado por Schmid, 1975. El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones que provoca la sustancia investigada en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo.

Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos durante la división celular como fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados (Hayashi y col., 1994; Yiqiang y col., 2005; Mazumdar y col., 2011; Carvalho y col., 2011; Di Giorgio y col., 2011; Bowen y col., 2011; LeBaron y col., 2013). Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, en caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado (Hayashi y col., 1994; Carvalho y col., 2011; Di Giorgio y col., 2011; Bowen y col., 2011; LeBaron y col., 2013). Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas (Hayashi y col., 1994; LeBaron y col., 2013).

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en sangre periférica también se lleva a cabo en otras especies en las que se

demuestre que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos con micronúcleos o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados (Hayashi y col., 1994; Carvalho y col., 2011; Di Giorgio y col., 2011; Bowen y col., 2011; LeBaron y col., 2013).

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

Si bien los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies debido a las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes, estos pueden originar también considerables repercusiones negativas. Entre las más importantes están la pérdida de la viabilidad celular, cambios fenotípicos en el organismo o en la descendencia, retardo mental, malformaciones congénitas, infertilidad y cáncer como se observa en la especie humana (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; Kramer, 2000). Se conoce con exactitud la relación entre la exposición a sustancias genotóxicas, ya sea de forma ocupacional, accidental o por estilos de vida (hábitos), y el incremento del riesgo de padecer cáncer (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; Kramer, 2000; Yiqiang y col., 2005; Mazumdar y col., 2011).

El ensayo citogenético *in vivo* de aberraciones cromosómicas es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, y que pueden variar según la especie y el tejido, descrito por primera vez por Legator y col., (1969). La mayor parte de las aberraciones inducidas por mutágenos químicos son de tipo cromatídico (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; Kramer, 2000).

La ocurrencia de aberraciones cromosómicas (AC), generalmente se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento. En este ensayo se utilizan células de médula ósea de roedores expuestos a las sustancias de ensayo. El tejido diana es la médula ósea por estar más vascularizado y por contener una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad. Antes de someter a los animales a la eutanasia, se tratan por medio de sustancias como la colchicina, que actúan como inhibidores del huso mitótico, con el fin de acumular las células en una fase de mitosis del tipo metafásico. A partir de las células se efectúan preparaciones de cromosomas que son secadas y luego teñidas; a continuación se

analizan las metafases en el microscopio para observar las aberraciones cromosómicas (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; Kramer, 2000).

- Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en roedores

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide determina la inducción de daño a nivel de las células germinales en el macho, el cual en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo. Dentro de los ensayos de genotoxicidad dada por su gran sensibilidad, esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales, ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo (Wyrobek y Bruce, 1975; Obidike y col., 2007; Wakui y col., 2007; Domínguez y col., 2009).

Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce., (1975), lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, amorfos, sin gancho y con dos colas (Wyrobek y Bruce, 1975; Obidike y col., 2007; Wakui y col., 2007; Domínguez y col., 2009).

El esquema desarrollado por Wyrobek y Bruce, 1975, establece 5 administraciones en días alternos o sucesivos y posteriormente, establecer un tiempo de reposo o sin administrar hasta llegar al total de días que dura la espermatogénesis en la especie roedora que se utilice. Si embargo, muchos autores establecen que es más apropiado en caso de productos naturales y otros administrar de forma crónica el producto durante toda la espermatogénesis, e incluso se ha aprobado protocolos donde este estudio es incluido dentro de ensayos de toxicidad crónica con administraciones por vía oral por 12 meses (Kempinas y col., 1988; Obidike y col., 2007). Constituye una desventaja del diseño de administraciones planteado por Wyrobek y Bruce., (1975), el ser administrado el producto solo en 5 veces en días alternos, pues de esta forma solo se evalúa el efecto subagudo a la exposición de la sustancia evaluada y no establece efectos crónicos.

Se puede realizar lo mismo en ratones que en ratas, tanto en una especie como en la otra, la

sustancia a evaluar se administra a los animales por un ciclo espermático completo que en el ratón corresponde a un tiempo de 35 días y en la rata de 52 días (Kempinas y col., 1988; Shayne, 2007).

2.15. Mutágenos controles positivos más utilizados en ensayos de genotoxicidad *in vivo* y su mecanismo mutagénico

2.15.1. Ciclofosfamida

La ciclofosfamida (CF) es un citostático potente que pertenece al grupo de los alquilantes de base, su uso como control positivo se evalúa ampliamente en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad (Mani y col., 1995; Porter y Singh, 1998; Matuo y col., 2007). Se conoce que este mutágeno no tiene especificidad por alguna fase del ciclo en particular, actúa sobre cualquiera de ellas con excepción de la G₀ (Prieto y col., 1999; Chahoud y col., 2002). Estos agentes poseen grupos químicos en su estructura que tienen la propiedad de unirse en forma covalente con elementos nucleofílicos de las células, al reemplazar un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en la molécula del ADN. Generalmente en el nitrógeno 7 de la guanina (Mani y col., 1995; Porter y Singh, 1998; Prieto y col., 1999; Chahoud y col., 2002; Matuo y col., 2007).

La mayoría de los agentes alquilantes como la CF se consideran bifuncionales debido a que poseen dos radicales activos que reaccionan con grupos intracadena que forman puentes con el filamento molecular helicoidal que determinan la muerte celular. La actividad de la CF es máxima durante la replicación celular, cuando parte del ADN no está apareado y es más susceptible a la alquilación. Es por ello que la CF es más dañina al ADN durante la fase de división celular, pues es cuando los cromosomas de la célula están más expuestos a la acción de agentes externos, por lo cual se analizan las células en metafase. Se trata de que las células a analizar confluyan todas en una fase puntual de la división celular, en el caso de la mayoría de los estudios realizados es en metafase (Mani y col., 1995; Porter y Singh, 1998; Prieto y col., 1999; Chahoud y col., 2002; Matuo y col., 2007).

2.15.2. Bleomicina

Es el nombre genérico de un grupo de antibióticos polipeptídicos derivados de *Streptomyces verticillos*. La bleomicina de uso clínico está integrada por diversos componentes; la bleomicina A supera el 55 % de la asociación (Mani y col., 1995; Prieto y col., 1999; Bolzán y col., 2011).

El mecanismo de acción antitumoral de la bleomicina consiste en fragmentar las cadenas de

ADN, dependiente de la interacción de las moléculas de O₂ del antibiótico con iones ferrosos o cúpricos. Cuando la bleomicina se intercala entre las cadenas del ADN, a merced del alto contenido de O₂ que tiene en su molécula y en presencia de agentes reductores, la bleomicina se activa por la citocromo P-450 ejerciendo acciones enzimáticas oxidativas mediante la producción de radicales libres o peróxidos que poseen una potente actividad destructora del ADN. Las células tumorales son más susceptibles a la bleomicina durante la proliferación activa y se tardan específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular (Mani y col., 1995; Prieto y col., 1999; Bolzán y col., 2011).

En clínica la principal vía de aplicación es la endovenosa, mientras que la subcutánea e intramuscular son vías alternativas. En experimentación la vía i.p es la más explotada pues es menos invasiva puesto que no se debe administrar por vía oral debido a la deficiente absorción e inactivación intestinal y hepática. Una particularidad en la cinética de la bleomicina y que probablemente influye en los mecanismos de resistencia a la misma, es la biotransformación que experimenta en la mayoría de los tejidos por la enzima bleomicina-hidrolasa, excepto en piel, pulmón y en ciertas neoplasias (Povirk y Austin, 1991; Bolzán y col., 2008).

Las mayores concentraciones de bleomicina registradas en éstos tejidos posiblemente sean consecuencia de carencias en la enzima antes citada. El fármaco desaparece rápidamente del plasma. La excreción renal alcanza el 60-70% en 24 horas (Prieto y col., 1999).

2.16. Biomodelos experimentales en ensayos de genotoxicidad, uso de diferentes especies

Como biomodelos en ensayos de genotoxicidad se utilizan con mayor eficiencia los roedores y entre ellos los ratones y las ratas (Pfuhrer y col., 2009). El uso de diferentes líneas de ratas y ratones en los ensayos de genotoxicidad es cada día mayor. Por esta razón, los resultados se hacen cada vez menos comparables, cuando se necesita de la comparación de sus resultados con fármacos y/o principios activos reconocidos, que dentro de sus ventajas se establezca o proponga un mayor margen de seguridad (Alamone y col., 1994; Hobbs y col., 2009; Recio y col., 2010; Carvalho y col., 2011; Di Giorgio y col., 2011; Bowen y col., 2011; Thybauda y col., 2011; LeBaron y col., 2013).

En el caso en particular del ensayo de micronúcleos hace varias décadas se publican resultados de los índices de daño espontáneos en biomodelos experimentales que incluyen diferentes líneas de ratas y ratones, sin embargo, poco se conoce o no se establece que exista una diferencia de tasas

de daños espontáneos e inducidos que permita utilizar un biomodelo más sensible (Alamone y col., 1994; Hobbs y col., 2009; Recio y col., 2010; Thybauda y col., 2011; LeBaron y col., 2013). Para el caso del ensayo cometa, aberraciones cromosómicas y morfología de la cabeza del espermatozoide estas bases de datos aún no están completas.

Existen evidencias de que las diferencias epigenéticas entre líneas de roedores de una misma especie determinan la respuesta al medio ambiente, a los xenobióticos y al principio activo en investigación, sobre todo vinculadas a su metabolismo, producto al alto polimorfismo genético de la enzima P-450 (Amri y col., 1986; Bell y col., 1993; Jana y col., 1998). Las técnicas desarrolladas en la citogenética son igualmente utilizadas para determinar daño al ADN por sustancias tóxicas como el ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y cometa.

Para evidenciar el estudio y la importancia de la diferenciación epigenética entre líneas de roedores se toman como referencia estudios donde se demostró que estas diferencias determinan que haya mayor o menor respuesta farmacológica y/o fisiológica a nuevos ingredientes activos (Oyarzabal, 2011), como el peso corporal, estrés social, efecto antidepressivo por la prueba de suspensión por la cola (Porsolt y col., 1978; Crusio y col., 1991; Crawley y col., 1997; Liu y Gershenfeld, 2001; Ripoll y col., 2003; Bernardi y col., 2011). Por lo que el hecho de que las diferencias epigenéticas entre líneas de roedores causa diferencias en las tasas de daño al ADN no es un tema totalmente novedoso.

También se estudió que la variación genética de diferentes líneas de ratones evidenció diferencias en la instauración del desarrollo de la inflamación aguda del pulmón (Almb y col., 2010). Además las diferencias epigenéticas entre diferentes líneas de ratones determinan la respuesta neurológica a diferentes fármacos, sobre todo en estudios de conducta animal que incluyen los estudios de nado forzado y coordinación del sistema locomotor (Vicens y col., 1999; Bearzatto y col., 2005).

2.17. Biomodelos de antigenotoxicidad *in vivo*, situación actual

Los biomodelos de antigenotoxicidad *in vivo* se utilizan poco, aún a varias décadas de haber sido estudiado el primer modelo animal induciendo daño al ADN, para posteriormente demostrar el efecto o mecanismo reparador de determinados fármacos. Pero el principal problema no radica en el uso o explotación de estos modelos, sino que no existe una armonización a nivel regulatorio que incluya la batería de sustancias aprobadas a utilizar, la dosis, vía y número de exposición. No

existe en estos días una sola regulación que se dedique a estos ensayos.

Al ser el modelo animal un organismo en el cual intervienen varios sistemas de órganos, es decir un modelo complejo, es difícil demostrar el efecto reparador al ADN de un nuevo fármaco una vez que se indujo daño con un mutágeno, además el utilizar un solo mutágeno hace estrecho el criterio de cuáles daños al ADN es capaz de reparar la sustancia en estudio.

Por estas razones, la mayoría de las sustancias con efecto antígenotóxico comprobado se evalúan en fase preclínica en ensayos *in vitro* al utilizar microorganismos sobre todo procariontes o líneas celulares (Celikler y col., 2008; Blasi y col., 2012; Charoensin y col., 2013).

Estos modelos permiten el estudio de un efecto reparador en particular con uso de técnicas de biología molecular, además con el uso de estos ensayos se trata de conocer el mecanismo reparador de daño al ADN puntual o en algunos casos se logra conocer el efecto reparador por más de un mecanismo (Celikler y col., 2008; Tirunilai, 2012; Mishra, 2012; Blasi y col., 2012). Este tipo de estudio se priorizan en los últimos años, pues cada vez aumentan los efectos adversos de los medicamentos antineoplásicos, por tanto, se priorizan las líneas de investigación que establecen la búsqueda de principios activos obtenidos de fuentes naturales que administradas antes, coadministradas o post-administradas con el medicamento antineoplásico ayuden a minimizar los efectos adversos a nivel del genoma (Celikler y col., 2008; Blasi y col., 2012; Diab y col., 2012; Charoensin y col., 2013).

Se debe tener en cuenta, para inducir el daño al ADN, la dosis farmacológica efectiva del mutágeno a utilizar, el número de exposición a la sustancia y por último la vía más efectiva para no lograr un efecto sistémico alto pero si a nivel de la célula diana a analizar según el tipo de ensayo antígenotóxico a utilizar (Díaz y col., 2008; Celikler y col., 2008; Blasi y col., 2012; Diab y col., 2012; Charoensin y col., 2013).

2.18. Potencial farmacológico y toxicológico de derivados de *Carapa guianensis*

Carapa guianensis pertenece a la familia *Meliaceae*, es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo; en Cuba se conoce como Cedro Macho.

La caracterización del aceite de la semilla de *Carapa guianensis* reveló la presencia de ácidos grasos merístico, palmítico, oleico, linoleico, esteárico y ácido araquidónico. Algunos tetraterpenoides se aislaron de la semilla de *Carapa guianensis*, nombrados como, 6-alfa-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-deacetoxina-7-oxogedunina, gedunina, andirobina, metil angolensatedina,

1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecilico acil-glicérido, ácido hexacosanoico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-dihidroximetilbenzoato, 2,6-dihidroximetilbenzoato, ácido tetratriacontanoico, ácido triacontanoico, epoxiazadiradiona, 6-alfahidroxigedunina (Qi y col., 2004).

También se conoce que los tetraterpenoides obtenidos de la semilla de la *Carapa guianensis* tienen una significativa actividad antialérgica, dado por la inhibición del factor nuclear kB y la supresión de la IL-5 y el CCL11/eotaxina (Penido y col., 2006).

Se ha investigado el potencial antioxidante, la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis* (Tonini y Arco, 2005; Ambrozín y col., 2006; Ferrari y col., 2007, Gonçalves y col., 2009; Alonso y col., 2012). Los estudios fitoquímicos de los extractos obtenidos en estas regiones denotan la presencia mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados y de compuestos fenólicos tales como taninos y limonoides.

La administración oral del extracto oleoso obtenido de la semilla de *Carapa guianensis* durante tres semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, co-administradas con una sustancia oxidante, demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno (Alonso y col., 2012).

Los estudios de toxicidad aguda y subaguda por vía oral realizados en ratas Wistar revelaron que el producto no es tóxico. La dosis letal media (DL₅₀) fue de 5 000 mg/kg de peso corporal (Costa-Silva y col., 2008), aunque en la subaguda se detectó un ligero aumento del peso de hígado y de los valores de Transaminasa Glutámico Pirúvico (TGP) en dosis con valores mayores a 1 500 mg/kg. Las investigaciones que se realizaron para la detección de posibles efectos en la reproducción al utilizar ratas Wistar administradas durante el periodo de pre concepción y desarrollo embrionario demostró que la exposición al producto por vía oral a dosis menores de 1 500 mg/kg de peso corporal no causa ningún daño al embrión ni a la fertilidad de la madre (Costa-Silva y col., 2007).

No obstante, existen evidencias que demuestran que el extracto antes mencionado provoca problemas de infertilidad en dosis repetidas, no siendo investigadas para demostrar su relación directa con la fertilidad del macho (Costa y col., 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y métodos generales

3.1.1. Aspectos éticos

Todos los procedimientos se realizaron sobre la base de buenas prácticas de laboratorio preclínico presentes en el reglamento nacional de aprobación de protocolos de investigación de la República de Cuba (CECMED, 2012). Además, al comenzar cada uno de los protocolos de investigación se obtuvo por escrito el consentimiento de aprobación del protocolo por el Comité Institucional de Ética para la Experimentación Animal de las instituciones que se involucraron en esta investigación (CECMED, 2012). Durante todos los experimentos, se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (CCAC, 1997).

3.1.2. Animales

Se utilizaron ratones adultos jóvenes de ambos sexos (8-9 semanas), de las líneas BALB/c, OF-1, NMRI, C57BL/6 cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g y ratas adultas jóvenes de ambos sexos de 6-8 semanas de edad de las líneas genéticas Sprague-Dawley (SD), Lewis y Wistar, cuyo peso corporal oscilaba entre 180-200 g al término de la cuarentena. Todos los animales fueron suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

3.1.3. Condiciones de tenencia y alimentación

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de $60\pm 10\%$, y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum* (pienso para ratas y ratones, todo propósito, esterilizable, que no requiere suplemento dietético: fórmula EMO1002, el cual fue suministrado por el CENPALAB). Estas características fueron comunes para todos los grupos y todos los ensayos realizados.

3.1.4. Evaluación clínica

Se realizaron dos observaciones diarias: en el horario de la mañana, entre las 8:30-10:30 a.m y en la tarde, entre 3:00-4:30 p.m. En cada observación se tuvo en cuenta el estado general del animal, que incluyó la palpación y la detección de lesiones, así como las posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, del sistema cardiovascular, del gastrointestinal, el estado de la piel, del pelo, la coloración de las mucosas y de los ojos (Shayne, 2007).

3.1.5. Métodos de eutanasia empleados

El día antes de la eutanasia programada, en el horario de la tarde 5:00 p.m se retiró el alimento en todos los grupos experimentales de esta investigación. La eutanasia en los ratones se realizó por dislocación cervical previa atmósfera de éter y en las ratas bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de los reflejos, según establece la Unión Europea y la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) (WPR, 1997; AVMA, 2000; UE, 2007).

3.1.6. Técnicas citogenéticas que se emplearon

3.1.6.1. Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (ensayo cometa alcalino)

-Toma de las muestras de sangre

Para proceder a la extracción de 15 μ L de sangre de la cola, los animales se ubicaron en un cepo, dejando la cola fuera del área del cepo. Posteriormente, se vertió la sangre en un vial que contenía 10 μ L de heparina sódica, de los laboratorios LIORAD, a una concentración de 5 000 UI/mL. Las muestras se manipularon a 4°C. El muestreo se efectuó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN, lo que permitió disminuir los falsos positivos y que la manipulación no constituyera un factor determinante de los resultados (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004; Lillford y col., 2010).

Las muestras de sangre se suspendieron en 140 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. A continuación 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, con un pH=10) durante 90 min a 4 °C y sometidas a 20 min de desenrollado en solución reguladora de electroforesis (3% NaOH 10 N, 0,5% EDTA 200 mM, a un pH > 13). La electroforesis se efectuó a 300 mA y 1 V/cm durante 18 a 20 min. Las láminas se lavaron con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0,4 M, a un pH= 7,5, y se aclararon con agua destilada.

La tinción se hizo con nitrato de plata al 0,05%. Los nucleoides teñidos se evaluaron mediante un microscopio de transmisión de luz, por tres observadores independientes, para establecer un promedio entre lecturas (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004; Lillford y col., 2010).

- Análisis visual

Se analizaron 200 leucocitos por animal y 100 leucocitos por gel. Se cuantificaron 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa se clasificó acorde con la categoría o el grado de daño en el

ADN que podía corresponder entre 0 y 4 (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004; Lillford y col., 2010).

La magnitud del daño en el ADN se expresó en unidades arbitrarias (UA), de acuerdo con lo publicado por Collins, (2004), a partir de valores posibles en un rango de 0 a 400 (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004; Lillford y col., 2010). Se determinó igualmente la longitud de migración del ADN como parámetro de daño por apoptosis celular.

El procedimiento para el cálculo de las UA fue:

$$UA = 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4$$

- 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 bajo, con frecuencia baja de lesiones en el ADN).
- TCG3 = Total de células, grado 3 (daño alto, con frecuencia alta de lesiones en el ADN).
- TCG4 = Total de células, grado 4 (células totalmente dañadas).

3.1.6.2. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó suavemente por flujo al introducir una aguja con jeringuilla cargada con 3 mL de suero bovino fetal (SBF) (Hayashi y col., 1993; Alamone, 1994; Tice y col., 1994; OECD, 1997; Preston y col., 1999; Jia, 2003).

Al obtener la médula se diluyó con el SBF y se centrifugó a 100 G por 10 min 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 durante 24 h a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 min, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 min (Hayashi y col., 1994; Alamone, 1994; Tice y col., 1994; OECD, 1997; Preston y col., 1999; Jia, 2003).

Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones se realizaron “a ciegas”, al utilizar un microscopio Olympus BH-2 (100x). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal para calcular el índice de citotoxicidad por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos. Además, se procedió a calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos que se establecen como parámetro de genotoxicidad y cuantificar el número de MN totales (Hayashi y col., 1993;

Alamone, 1994; Tice y col., 1994; OECD, 1997; Preston y col., 1999; Jia, 2003).

3.1.6.3. Ensayo citogenético de aberraciones cromosómicas en eritrocitos de médula ósea

En el horario de la mañana (4 h antes de la eutanasia), la división celular en metafase se detuvo al utilizar colchicina (4 mg/kg, vía i.p). Un fémur de cada animal se extrajo y la cavidad medular se lavó con 3 mL de SBF. La suspensión celular se centrifugó a 100 G y se eliminó el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCL (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 min. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10% durante 30-35 min (OECD, 1997a; Fielder y col., 1999; Kramer, 2000; OECD, 2009).

Se contabilizaron 100 metafases por animal, se determinó el número de células con aberraciones (rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos) y frecuencia de *Gaps* (de sus siglas en inglés). También se calculó el índice mitótico IM% (porcentaje de metafases en 1000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1000 células leíbles. Las determinaciones fueron leídas por dos observadores al utilizar un microscopio Olympus BH-2 (100x), para a continuación establecer un promedio entre ambas determinaciones (OECD, 1997a; Fielder y col., 1999; Kramer, 2000; OECD, 2009).

3.1.6.4. Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide

Al no estar este ensayo regulado, se realizó según las normas de la ICH, 2005, sobre toxicología de la fertilidad del macho, y la Sociedad Británica de Toxicología y Mutagénesis Ambiental (Fielder y col., 1999; ICH, 2005), que establece el estudio de los espermatozoides de epidídimos de los machos tratados en el ensayo de fertilidad. Además, se tuvo en cuenta el estudio realizado por Kempinas y col., (1988), para establecer la concentración de espermatozoides en el epidídimos, para el caso de las clasificaciones de las anomalías de la cabeza del espermatozoide se tuvo en cuenta los criterios morfológicos establecidos por Wyrobek y Bruce, (1975). Para realizar este ensayo se procedió a extraer ambos epidídimos en el caso de los ratones, para el caso de las ratas solo se procesó un epidídimo. Los epidídimos se redujeron a pequeños fragmentos, y se depositaron en placas Petri que contenían 3 mL de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur (Kempinas y col., 1988; Fielder y col., 1999; ICH,

2005).

- Recuento 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 5 min de tripsinización se añadieron 2 mL más de NaCl 0,9%. Posteriormente se realizó una dilución del homogeneizado tripsinizado en NaCl-formol al 1% (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, teniendo en cuenta el conteo a ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2 (10x) (Kempinas y col., 1988; Fielder y col., 1999; ICH, 2005).

- Morfología del espermatozoide

Al tubo que contenía la dilución del homogeneizado ya diluido se añadieron 10 μ L de eosina Y al 1%, y se dejó reposar por 5 min. 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 con la ayuda de un microscopio Olympus BH-2 (40x) (Wyrobek y Bruce, 1975; Fielder y col., 1999). Las observaciones fueron realizadas “a ciegas” por dos observadores independientes, para establecer un promedio entre ambos. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana, sin gancho y con dos colas (Wyrobek y Bruce, 1975; Fielder y col., 1999). Además, se calculó el porcentaje de gota citoplasmática como indicador de citotoxicidad, fertilidad e inmadurez sexual.

3.2. Comparación del daño genotóxico espontáneo e inducido a diferentes niveles de expresión en el ADN entre varias líneas de ratón y de rata

3.2.1. Diseño experimental

3.2.1.1. Criterios de comparación y evaluación de la eficiencia en las técnicas citogenéticas realizadas

En un primer paso se determinaron las tasas espontáneas e inducidas con ciclofosfamida (CF) de las líneas de ratón BALB/c, OF-1, NMRI, C57BL/6 y de ratas SD, Lewis y Wistar, de ambos sexos. A continuación se procedió a comparar los índices espontáneos e inducidos entre las diferentes líneas de ratones en ambos sexos y a la par se compararon las de ratas. Posteriormente, se compararon los valores espontáneos e inducidos entre la línea de ratón y de rata más eficiente, teniendo en cuenta que se aceptó como especie murina más sensible aquella que tuviera los índices de daños endógenos al ADN más bajos y una buena respuesta inductora de daño al

mutágeno utilizado. Para la respuesta al daño inducido se tuvo en cuenta que los valores deberían diferir significativamente con los valores de los grupos controles. En todos los casos, se comparó la eficiencia de los biomodelos a utilizar, teniendo en cuenta, los valores de sus índices espontáneos e inducidos de las variables que se analizaron en los ensayos que se describen en el acápite 3.1.6.

3.2.1.2. Administración y dosificación

Los animales se distribuyeron de manera aleatoria (5 ratones o ratas/grupo/sexo/línea). Se realizaron dos réplicas de cada estudio, para establecer un promedio entre ambas, para un total de 10 animales/grupo/sexo. En el caso del ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide (EMCE), solo se utilizaron ratones o ratas machos, 8/grupo/réplica para un total de 16 animales/grupo. Esto fue válido también para el acápite 3.3 (ensayos de antigenotoxicidad), en particular, en el acápite 3.3.1.2.

Las concentraciones de las sustancias a administrar se ajustaron semanalmente, según el aumento del peso corporal. Antes de la administración de las sustancias por vía oral, se tuvo en cuenta el tiempo establecido para el vaciamiento del estómago al no administrar más alimento, siendo en ratones de 4 horas y en ratas 12 horas de ayuno. Esto fue válido para todos los experimentos que se realizaron, en los cuales se administraron sustancias por vía oral.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados como control negativo. Se les realizó la técnica de entubación gástrica durante 14 días, para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones que los otros grupos.

En el grupo experimental 2 se utilizó Tween 65 al 2%, vehículo presente en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo.

En el grupo experimental 3 se utilizó NaCl al 0,9%, disolvente de la mayoría de las sustancias hidrofílicas. Se administró por vía oral 2 mL/kg durante 14 días, se preparó 2 h antes de la administración. Ambos grupos experimentales 2 y 3 se prepararon dos horas antes de su administración por vía oral 2 mL/kg durante 14 días.

En el grupo experimental 4, como control positivo (daño inducido), se emplearon 50 mg/kg de ciclofosfamida (CF), por vía intraperitoneal (i.p), de la firma comercial mexicana Lemery S.A., con la marca LEDOXINA. Se diluyó en NaCl al 0,9%, y se administró a los animales inmediatamente después de ser preparada (10 mL/kg), 48 y 24 h antes de la eutanasia.

Para el caso del EMCE los animales se administraron 35 días consecutivos en los ratones y 52 días en las ratas en los grupos experimentales del 1 al 3. Los animales tratados con CF se administraron 5 días consecutivos y estuvieron sin administrarse 35 días (ratones) y 52 días (ratas), duración del ciclo espermático de cada una de las especies (Wyrobek y Bruce, 1975; Shayne, 2007).

3.3. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en diferentes diseños experimentales en la línea de ratón y de rata seleccionada como biomodelos de antigenotoxicidad

3.3.1. Diseño experimental

3.3.1.1. Criterios de aceptación de los diferentes diseños en que se utilizaron los mutágenos para inducir daño al ADN

Al comparar los diferentes diseños en que se utilizaron la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL) para inducir daño al ADN, se tuvo en cuenta como criterio de aceptación, aquel diseño en que se lograra inducir mayor nivel de daño, siendo significativamente diferente a los otros y a los controles, además, que los valores experimentaran una baja variabilidad (valores bajos de desviación estándar entre réplicas).

Estos ensayos se realizaron al utilizar la línea de ratón BALB/c y de ratas SD, que previamente se seleccionaron como biomodelos experimentales más sensibles, para aumentar la robustez de las pruebas. Se realizó el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en ratas Sprague Dawley, en cambio el ensayo de MN, AC en células de la médula ósea y el EMCE se realizó en ratones BALB/c; según las técnicas que se establecieron en el acápite 3.1.6.

3.3.1.2. Administración y dosificación

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el NaCl al 0,9% de la firma BDH (BDC). Se administró por vía i.p a 10 mL/kg en dos administraciones con intervalos de 24 h entre ambas.

En los grupos experimentales 2 y 3, se utilizó la CF, con un 98% de pureza. La CF se administró inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 h antes de la eutanasia programada para el grupo 2 y 24 h antes de la eutanasia para el grupo 3. En ambos grupos, se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, el cual se disolvió en NaCl al 0,9% y se administró 10 mL/kg. La dosis y vía en que se utilizó la CF se corresponde con la variante más apropiada, la cual se

estableció a partir de resultados previos, donde se evaluaron tres dosis (25, 50 y 100 mg/kg) y tres vías: la intramuscular, intravenosa y la i.p. Se decidió utilizar la vía i.p y la dosis de 50 mg/kg pues se correspondió con los mejores resultados de inducción de daño al ADN sin daños sistémicos aparentes. Los resultados de este estudio fueron válidos para escoger la dosis y vía del mutágeno a utilizar en los acápites 3.2 y 3.4, respectivamente.

En los grupos experimentales 4 y 5, se utilizó la BL con un 98% de pureza, de los Laboratorios PISA de México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo). La BL se administró inmediatamente después que se preparó, 48 y 24 h antes de la eutanasia para el grupo 4 y 24 h antes de la eutanasia para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 20 mg/kg, para el caso del biomodelo ratón y 40 mg/kg en las ratas, por vía i.p, el cual se disolvió en NaCl al 0,9% y posteriormente se administró a razón de 10 mL/kg. La dosis y vía que se utilizó de la BL se corresponde con la variante más adecuada, la cual se estableció a partir de resultados previos, donde se evaluaron cuatro dosis (10, 20, 40 y 100 mg/kg) y cuatro vías: la intramuscular, intravenosa, subcutánea y la i.p.

3.3.1.2a. Administración y dosificación en el ensayo de antigenotoxicidad de EMCE

Este ensayo se realizó en ratones machos BALB/c. En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el NaCl al 0,9 %, de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza. Se administró por vía oral durante un periodo de 35 días, tiempo que coincide con la duración del ciclo espermático de esta especie. En el grupo experimental 2 se utilizó la CF, en dosis de 50 mg/kg y en el grupo experimental 3 la BL, en dosis de 20 mg/kg. Ambas sustancias se diluyeron en NaCl al 0,9 % y se administraron por vía i.p 10 mL/kg, durante 5 días consecutivos y posteriormente estuvieron sin administrarse 35 días.

3.4. Evaluación del efecto genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet a diferentes niveles de expresión de daño al ADN utilizando la línea murina más sensible

Para evaluar el potencial genotóxico *in vivo* del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* se realizó el ensayo cometa en ratas SD de ambos sexos. En el ensayo de MN, AC y el EMCE, se utilizaron ratones BALB/c. Las técnicas y las variables a analizar fueron las que se establecieron en el acápite 3.1.6.

3.4.1. Extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet utilizado

El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet que se utilizó corresponde con el extracto de la firma Raintreen Nutrition bajo la marca de AMAZON ANDIROBA OIL®. En los Anexos 1 y 2 se muestran las especificaciones de su uso y los componentes de este extracto aportados por los proveedores de la firma antes mencionada. La densidad aparente del aceite (conservado a -20 °C hasta su uso), fue calculada (0,81 g/mL) y este resultado se utilizó para definir el volumen exacto que cada animal recibió.

3.4.2. Diseño experimental

3.4.2.1. Administración y dosificación

El extracto oleoso se suspendió en Tween 65 (2 %), 2 h antes de la administración y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Se propuso emplear la vía oral por ser la que coincide con la propuesta en la terapéutica y además, la que se empleó en el resto de las evaluaciones de toxicología preclínica (Alonso y col., 2012). Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 animales/grupo/sexo), 5 grupos experimentales: un grupo control con el vehículo (Tween 65, 2 %), tres grupos que se trataron con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) y un control positivo que se administró con CF, mutágeno de reconocida potencia validado para este ensayo.

Las emulsiones que se realizaron con el extracto y el vehículo se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg) durante 14 días. La CF se administró en dos dosis (50 mg/kg) por vía i.p 48 y 24 h previas a la eutanasia. La dosis menor del extracto se empleó en estudios farmacológicos preclínicos (Penido y col., 2006; Ferrari y col., 2007; Costa y col., 2007, 2008), con la que se demostró su potencial farmacológico en modelos contra *Leishmania*, cáncer de útero y como antioxidante y dos niveles superiores múltiples de este (1 000 y 2 000 mg/kg) (Costa y col., 2007, 2008).

Para el caso del EMCE, los animales se distribuyeron aleatoriamente (8 ratones/grupo), teniendo en cuenta los mismos grupos experimentales que se mencionaron con anterioridad en este mismo epígrafe. Las emulsiones que se realizaron con el extracto y vehículo se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg) durante 35 días. La CF se administró 5 días consecutivos (50 mg/kg) por vía intraperitoneal en el mismo horario. Después los animales estuvieron 35 días de reposo, sin recibir administración, según se establece para este ensayo (Wyrobek y Bruce, 1975).

3.5. Análisis estadístico

Las comparaciones entre todos los grupos y entre especies para analizar parámetros del ensayo cometa (UA, diferentes niveles de daño, longitud de daño al ADN) se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney (Duez y col., 2003; Vasquez, 2010). Se estableció un nivel de significación $p < 0,05$.

Para las variables continuas: frecuencia de EP portadores de micronúcleos, índice de citotoxicidad (EP/EN), índice mitótico, diferentes morfologías de la cabeza del espermatozoide y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática, se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza. Los resultados obtenidos estaban distribuidos normalmente (normalidad, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov), existió dependencia entre las observaciones y presentaron homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) (Wyrobek y Bruce, 1975; OECD, 1997; Adler y col., 1998, OECD, 2009). Por lo cual, se analizaron con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $p < 0,05$. Al diferir estas variables se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Las variables categóricas: número total de MN, número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN, número de células con aberraciones, frecuencia de *Gaps* (de sus siglas en inglés) y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos, el número de células con poliploidía y la concentración espermática, se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado y el nivel de significación establecido fue de $p < 0,01$ (Wyrobek y Bruce, 1975; OECD, 1997; Adler y col., 1998, OECD, 2009).

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación del daño genotóxico espontáneo e inducido a diferentes niveles de expresión en el ADN entre líneas de ratón y de rata

4.1.1. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre ratones de ambos sexos de las líneas BALB/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6

En ninguno de los estudios se evidenciaron síntomas clínicos indicativos de toxicidad. Esto reafirma que la dosis que se utilizó de cada una de las sustancias en estos ensayos no fue tóxica a nivel sistémico, pero se produjeron cambios en las células dianas que se analizaron cumpliendo con los objetivos propuestos.

En la Tabla 2 se observa el rango espontáneo del % de nucleoides grado 0 de cada una de estas líneas de ratones en ambos sexos. El porcentaje de nucleoides grado 0 espontáneos para el caso de la línea BALB/c se encuentra entre 50,82-57,47 en las hembras y de 49,97-55,50 en los machos. Teniendo en cuenta esta misma variable, pero en la línea OF-1, el % de nucleoides grado 0 espontáneo se encuentra para el caso de las hembras entre 48,34-53,85 y en los machos fue de 49,25-51,56. En la línea NMRI los valores fueron bajos comparados con las líneas BALB/c y OF-1 en ambos sexos; estos fueron de 43,98-45,71 % en las hembras y de 41,98-48,05 % en los machos. En la línea de ratón C57BL/6 este porcentaje se encuentra para las hembras entre 46,11-48,66 y para el caso de los machos está entre un 46,17-49,10. La longitud espontánea de migración del ADN como parámetro de daño por apoptosis fue menor en la línea de ratones BALB/c de ambos sexos con valores entre 60 y 64 μm .

Los resultados del ensayo de micronúcleos para las cuatro líneas de ratones que se evaluaron se muestran en las Tablas 3 y 4. Para la línea BALB/c, el índice de citotoxicidad (relación EP/EN), se encuentra en el rango espontáneo en los machos entre 1,16-1,19 y de 1,15-1,19 en las hembras. El índice de genotoxicidad dado por el % de EP que contienen micronúcleos se encuentra en los machos entre 0,16-0,18 % y en las hembras están en el rango de 0,13-0,17 %. Los resultados de la línea OF-1 teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad se encuentran entre 1,14-1,15 en los machos y en las hembras entre 1,12-1,14. Los resultados del índice de genotoxicidad para el caso de los machos están entre 0,18-0,21 % y 0,14-0,18 % en las hembras.

El índice de citotoxicidad en los ratones NMRI se encuentra entre 1,16-1,17 en los machos y en

Tabla 2. Ensayo cometa en ratones de ambos sexos de las líneas BALB/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6 sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos	Sexo	LM-ADN (μm)	Unidades Arbitrarias	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
				(% Nucleoides)				
Ratones C57BL/6 de ambos sexos								
CN ¹	H	69,48 \pm 4,47	55,40 \pm 8,34	46,11 \pm 7,10	42,9 \pm 2,85	5,50 \pm 5,99	0,46 \pm 0,16	0,03 \pm 0,01
	M	70,20 \pm 3,10	60,28 \pm 6,41	46,17 \pm 6,51	42,29 \pm 3,21	7,58 \pm 5,00	0,85 \pm 0,12	0,07 \pm 0,04
SV1 ¹	H	68,42 \pm 2,97	59,19 \pm 7,43	48,66 \pm 7,23	38,73 \pm 3,80	8,02 \pm 3,78	1,34 \pm 0,73	0,10 \pm 0,06
	M	67,99 \pm 3,12	60,88 \pm 7,52	49,10 \pm 8,45	40,34 \pm 5,10	8,67 \pm 4,92	1,00 \pm 0,48	0,05 \pm 0,03
SV2 ¹	H	69,15 \pm 3,52	56,28 \pm 8,10	47,52 \pm 8,00	37,29 \pm 4,70	6,99 \pm 4,70	1,59 \pm 0,21	0,06 \pm 0,03
	M	70,11 \pm 2,86	63,07 \pm 6,19	47,78 \pm 9,02	43,84 \pm 5,12	7,31 \pm 5,51	1,43 \pm 0,52	0,08 \pm 0,04
CP (CF) ²	H	87,84 \pm 9,10*	129,87 \pm 14,87*	18,81 \pm 4,13*	51,62 \pm 12,37*	13,22 \pm 6,26*	10,31 \pm 3,50*	5,22 \pm 4,52*
	M	88,51 \pm 9,30*	132,18 \pm 15,10*	17,53 \pm 5,00*	54,61 \pm 10,18*	11,69 \pm 5,14*	10,49 \pm 4,02*	5,68 \pm 3,95*
Ratones BALB/c de ambos sexos								
CN ¹	H	60,36 \pm 2,20	49,51 \pm 10,24d	56,00 \pm 8,01d	39,29 \pm 7,49	4,01 \pm 4,17d	0,60 \pm 0,68	0,10 \pm 0,05
	M	62,42 \pm 4,11	56,37 \pm 7,51	51,03 \pm 3,14	42,72 \pm 5,68	5,10 \pm 2,77d	1,15 \pm 1,05	0,00 \pm 0,00
SV1 ¹	H	61,87 \pm 3,85	57,23 \pm 10,20	50,82 \pm 9,32	42,13 \pm 2,22	6,05 \pm 5,28	1,00 \pm 0,93	0,00 \pm 0,00
	M	60,77 \pm 4,51	54,25 \pm 8,90d	55,50 \pm 9,01d	36,15 \pm 3,58d	7,00 \pm 4,66	1,30 \pm 1,45	0,05 \pm 0,03
SV2 ¹	H	63,75 \pm 3,04	52,15 \pm 10,31d	57,47 \pm 3,76d	34,27 \pm 8,58d	6,90 \pm 4,50	1,36 \pm 0,46	0,00 \pm 0,00
	M	61,21 \pm 2,47	56,33 \pm 7,62	49,97 \pm 10,03	44,92 \pm 2,02	4,00 \pm 5,76d	1,03 \pm 0,49	0,08 \pm 0,02
CP (CF) ²	H	80,99 \pm 8,80*d	118,02 \pm 13,28*d	23,33 \pm 5,22*d	53,02 \pm 10,64*	10,41 \pm 4,99*	8,78 \pm 3,90*	4,46 \pm 1,43*
	M	81,56 \pm 9,56*d	112,69 \pm 14,11*d	25,80 \pm 3,41*d	52,7 \pm 11,98*	9,37 \pm 1,90*d	7,03 \pm 2,01*	5,02 \pm 0,91*
Ratones OF-1 de ambos sexos								
CN ¹	H	71,52 \pm 3,35	57,40 \pm 9,64	49,10 \pm 8,09	44,90 \pm 3,05	5,50 \pm 6,07	0,50 \pm 0,86	0,00 \pm 0,00
	M	70,88 \pm 3,90	59,48 \pm 7,51	50,00 \pm 5,21	42,29 \pm 2,36	6,00 \pm 4,71	1,65 \pm 0,02	0,06 \pm 0,03
SV1 ¹	H	69,94 \pm 4,22	62,55 \pm 10,23	48,34 \pm 8,33	42,73 \pm 4,72	7,06 \pm 4,28	1,78 \pm 0,84	0,09 \pm 0,04
	M	69,61 \pm 4,66	57,68 \pm 8,49	51,56 \pm 7,55	40,34 \pm 3,90	6,98 \pm 4,48	1,10 \pm 0,98	0,02 \pm 0,01
SV2 ¹	H	71,18 \pm 4,05	56,27 \pm 10,11	53,85 \pm 7,12	37,29 \pm 7,10	7,60 \pm 4,60	1,26 \pm 0,91	0,00 \pm 0,00
	M	70,82 \pm 2,80	59,06 \pm 8,29	49,25 \pm 10,01	43,84 \pm 8,22	5,71 \pm 3,61	1,00 \pm 0,33	0,20 \pm 0,10
CP (CF) ²	H	89,10 \pm 7,41*	123,59 \pm 12,57*	22,00 \pm 3,23*	51,62 \pm 10,87*	12,05 \pm 3,56*	9,45 \pm 4,70*	4,88 \pm 3,02*
	M	88,91 \pm 8,67*	123,79 \pm 13,16*	21,54 \pm 6,40*	53,13 \pm 11,58*	10,33 \pm 4,34*	10,00 \pm 3,08*	5,00 \pm 2,17*
Ratones NMRI de ambos sexos								
CN ¹	H	70,11 \pm 3,40	63,84 \pm 8,24	45,71 \pm 6,09	45,99 \pm 2,05	7,05 \pm 6,09	1,25 \pm 0,34	0,00 \pm 0,00
	M	72,07 \pm 4,80	61,13 \pm 8,31	48,05 \pm 1,30	43,86 \pm 1,56	7,10 \pm 4,33	0,89 \pm 1,01	0,10 \pm 0,06
SV1 ¹	H	73,14 \pm 5,02	64,54 \pm 10,89	43,98 \pm 2,39	49,35 \pm 5,22	5,02 \pm 4,28	1,45 \pm 0,56	0,20 \pm 0,15
	M	69,95 \pm 3,88	65,22 \pm 10,56	43,57 \pm 7,41	49,61 \pm 3,18	5,10 \pm 4,36	1,47 \pm 1,20	0,25 \pm 0,10
SV2 ¹	H	71,28 \pm 5,25	67,74 \pm 10,31	44,26 \pm 4,99	47,29 \pm 1,40	6,90 \pm 6,41	1,55 \pm 0,81	0,00 \pm 0,00
	M	72,04 \pm 3,00	71,45 \pm 9,51	41,98 \pm 8,84	48,03 \pm 2,02	6,83 \pm 5,16	2,88 \pm 2,28	0,28 \pm 0,43
CP (CF) ²	H	90,05 \pm 3,91*	126,21 \pm 13,22*	19,00 \pm 3,27*	55,82 \pm 10,24*	11,00 \pm 2,09*	8,33 \pm 4,41*	5,85 \pm 4,00*
	M	88,84 \pm 4,15*	123,95 \pm 11,53*	20,40 \pm 5,37*	54,66 \pm 9,78*	10,50 \pm 3,68*	9,47 \pm 3,99*	4,97 \pm 5,80*

Control positivo (CP), CF: ciclofosfamida. ¹Administración por vía oral. ²Administración por vía intraperitoneal.
 *p<0,05 (comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney). (X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas). d=resultados que difieren entre BALB/c al compararlo con las líneas C57BL/6, OF-1 y NMRI. CN: Control negativo. SV1: Sustancia vehículo 1. SV2: Sustancia vehículo 2. LM: Longitud de migración del ADN. H: Hembras. M: Machos.

Tabla 3. Índice de citotoxicidad (EP/EN), MN totales e índice de genotoxicidad (MN-EP %), en ratones BALB/c y OF-1 de ambos sexos, utilizados como biomodelos en el ensayo de micronúcleos.

Grupos	n	EP/EN	MN totales	MN-EP (%)
Ratones BALB/c de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,18 ± 0,01d	23	0,16 ± 0,03
Sustancia Vehículo 1	10	1,16 ± 0,04d	26	0,18 ± 0,04
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,05d	25	0,18 ± 0,02
Control Positivo (CF) ^a	10	0,87 ± 0,03*	258*d	1,82 ± 0,89*
Hembras				
Control Negativo	10	1,15 ± 0,05	19	0,13 ± 0,04d
Sustancia Vehículo 1	10	1,17 ± 0,02	20d	0,14 ± 0,07d
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,04d	24d	0,17 ± 0,08
Control Positivo (CF) ^a	10	0,85 ± 0,02*d	233*d	1,65 ± 0,77*d
Ratones OF-1 de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,14 ± 0,01	26	0,18 ± 0,01
Sustancia Vehículo 1	10	1,16 ± 0,04	28	0,20 ± 0,03
Sustancia Vehículo 2	10	1,15 ± 0,05	30	0,21 ± 0,05
Control Positivo (CF) ^a	10	0,91 ± 0,06*	267*	1,89 ± 0,61*
Hembras				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,03	22	0,16 ± 0,05
Sustancia Vehículo 1	10	1,14 ± 0,06	25	0,18 ± 0,06
Sustancia Vehículo 2	10	1,13 ± 0,05	20	0,14 ± 0,04
Control Positivo (CF) ^a	10	0,89 ± 0,02*	251*	1,78 ± 0,58*

CF (Ciclofosfamida), ^aadministración por vía intraperitoneal. Determinación en 2000 células/animal y en 2000 EP/animal. *p<0,05 (comparación contra el control, prueba de ANOVA). (X media; DE desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0,01 (comparación contra el control, prueba de Chi-Cuadrado solamente para la variable MN totales). d = resultados que difieren al comparar las diferentes líneas de ratones utilizadas en el mismo sexo y tratamiento. . EP: Eritrocitos policromáticos. EN: Eritrocitos normocromáticos. MN: Micronúcleos.

Tabla 4. Índice de citotoxicidad (EP/EN), MN totales e índice de genotoxicidad (MN-EP %), en ratones NMRI y C57BL/6 de ambos sexos, utilizados como biomodelos en el ensayo de micronúcleos.

Grupos	n	EP/EN	MN totales	MN-EP (%)
Ratones NMRI de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,16 ± 0,02	27	0,17 ± 0,02
Sustancia Vehículo 1	10	1,17 ± 0,03	28	0,17 ± 0,02
Sustancia Vehículo 2	10	1,16 ± 0,03	30	0,19 ± 0,04
Control Positivo (CF) ^a	10	0,92 ± 0,05*	286*	1,80 ± 0,61*
Hembras				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,02	30	0,19 ± 0,05
Sustancia Vehículo 1	10	1,15 ± 0,05	26	0,16 ± 0,04
Sustancia Vehículo 2	10	1,15 ± 0,03	28	0,17 ± 0,03
Control Positivo (CF) ^a	10	0,90 ± 0,03*	280*	1,77 ± 0,53*
Ratones C57BL/6 de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,02	29	0,18 ± 0,02
Sustancia Vehículo 1	10	1,13 ± 0,03	31	0,20 ± 0,04
Sustancia Vehículo 2	10	1,14 ± 0,03	34	0,21 ± 0,04
Control Positivo (CF) ^a	10	0,94 ± 0,07*	275*	1,73 ± 0,72*
Hembras				
Control Negativo	10	1,10 ± 0,02	31	0,20 ± 0,01
Sustancia Vehículo 1	10	1,12 ± 0,04	28	0,18 ± 0,05
Sustancia Vehículo 2	10	1,09 ± 0,03	33	0,21 ± 0,01
Control Positivo (CF) ^a	10	0,93 ± 0,04*	282*	1,78 ± 0,81*

CF (Ciclofosfamida) .^aAdministración por vía intraperitoneal. MN: Micronúcleos. Determinación en 2000 células/animal y en 2000 EP/animal. *p<0,05 (comparación contra el control, prueba de ANOVA). (X media; DE desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0,01 (comparación contra el control, prueba de Chi-Cuadrado solamente para la variable MN totales). d = resultados que difieren al comparar las diferentes líneas de ratones utilizadas en el mismo sexo y tratamiento. . EP: Eritrocitos policromáticos. EN: Eritrocitos normocromáticos.

las hembras está entre 1,12-1,15, mientras que el índice de genotoxicidad se encuentra en el intervalo de 0,17-0,19 % en los machos y en las hembras esta entre 0,16-0,19 %. Al evaluar en este ensayo la línea de ratones C57BL/6, se encontró que el índice de citotoxicidad fue de 1,12-1,14 en los machos y en las hembras en el intervalo de 1,09-1,12, por lo cual, la línea C57BL/6 es la que manifiesta mayor daño espontáneo. Por otra parte, el índice de genotoxicidad estuvo en el rango de 0,18-0,21 % en los machos y de 0,18-0,21 % en las hembras; una vez más se demostró, que esta línea de ratones en ambos sexos presenta mayor porcentaje de EP portadores de micronúcleos.

En el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea se obtuvieron resultados similares al de micronúcleos, al comparar las cuatro líneas evaluadas (Tablas 5 y 6). Como resultado general, se detectó en mayor frecuencia las aberraciones de tipo cromatídicas, tal y como está descrito en la literatura, ya que este tipo de aberraciones son en su mayoría las que esta técnica citogenética es capaz de detectar (estructurales) (Tice y col., 1994). Teniendo en cuenta el número total de células con aberraciones, en la línea BALB/c se encontró valores de forma espontánea entre 7-10 en los machos y entre 8-9 en las hembras. La CF fue capaz de inducir en esta línea hasta 175 células con aberraciones en los machos y 192 en las hembras.

Para el caso de la línea NMRI este resultado de forma espontánea se encuentra en el rango de 7-11 células totales en los machos y en las hembras de 10-14 células totales con aberraciones, siendo superior, al compararlos con la línea BALB/c. Sin embargo, la línea de ratones NMRI demuestra ser más susceptible a la CF que la BALB/c; ya que este mutágeno logró inducir hasta 223 células totales con aberraciones en los machos y 219 en las hembras.

Al evaluar la línea de ratones OF-1 se obtuvo un mayor número de aberraciones de forma espontánea, lo que resulta significativo al compararla con las líneas BALB/c y NMRI. En la línea OF-1, se obtuvo un total de células con aberraciones que oscila entre 13-15 en los machos y de 12-16 en las hembras. Teniendo en cuenta las aberraciones inducidas por la CF, se obtuvo en los machos 239 células totales con aberraciones y en las hembras 253. Se obtuvo de forma espontánea un total de células con aberraciones que se encuentran entre 16-17 en los machos y de 14-18 en las hembras. La CF indujo en este biomodelo experimental un total de 254 células con aberraciones en los machos y 271 en las hembras, resultados que se encuentran por encima de los obtenidos en las líneas BALB/c, NMRI y OF-1.

Tabla 5. Comparación entre ratones BALB/c y OF-1 de ambos sexos en el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	# de Células con aberraciones ^b
Ratones BALB/c de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	5,65 ± 0,56a	1	4a	7a
Sustancia Vehículo 1	5,49 ± 0,53a	0	6	8a
Sustancia Vehículo 2	5,86 ± 0,20a	0	7	10
Control Positivo (CF) ¹	3,89 ± 0,24*a	14**a	47**a	175**a
Hembras				
Control Negativo	5,98 ± 0,22a	1a	6	8a
Sustancia Vehículo 1	4,98 ± 0,79a	0	5a	8a
Sustancia Vehículo 2	5,12 ± 0,63a	1	2a	9
Control Positivo (CF) ¹	3,93 ± 0,84*a	18**a	44**a	192**a
Ratones OF-1 de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	5,42 ± 0,31	2	7	13
Sustancia Vehículo 1	5,20 ± 0,56	1	8	15
Sustancia Vehículo 2	5,71 ± 0,20	1	5	14
Control Positivo (CF) ¹	3,27 ± 0,40*	19**	55**	239**
Hembras				
Control Negativo	5,66 ± 0,42	0	9	16
Sustancia Vehículo 1	5,46 ± 0,30	1	8	14
Sustancia Vehículo 2	4,99 ± 0,18	1	6	12
Control Positivo (CF) ¹	3,38 ± 0,35*	22**	58**	253**

CF (Ciclofosfamida). ¹Administración por vía intraperitoneal. ^aX ± D.E de un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas. *p<0,05; ANOVA (comparación contra el control negativo en cada línea evaluada y sexo). ^b**p<0,01; prueba no paramétrica χ^2 (comparación contra el control negativo en cada línea evaluada y sexo). ^a=p<0,05 (difiere al comparar entre las 4 líneas teniendo en cuenta la misma variable, grupo experimental, prueba estadística y sexo). IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.

Tabla 6. Comparación entre ratones NMRI y C57BL/6 de ambos sexos en el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	# de Células con aberraciones ^b
Ratones NMRI de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	5,42 ± 0,43	1	4	9
Sustancia Vehículo 1	5,33 ± 0,50	0	6	7
Sustancia Vehículo 2	5,10 ± 0,32	0	3	11
Control Positivo (CF) ¹	3,52 ± 0,21*	15**	45**	223**
Hembras				
Control Negativo	5,12 ± 0,23	1	8	12
Sustancia Vehículo 1	5,21 ± 0,55	2	2	14
Sustancia Vehículo 2	5,03 ± 0,48	1	5	10
Control Positivo (CF) ¹	3,68 ± 0,12*	20**	51**	219**
Ratones C57BL/6 de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	5,82 ± 0,95	2	10a	17a
Sustancia Vehículo 1	5,20 ± 0,28	0	9	16a
Sustancia Vehículo 2	5,59 ± 0,33a	3a	11a	16a
Control Positivo (CF) ¹	3,46 ± 0,29*	21**a	60**a	254**a
Hembras				
Control Negativo	5,21 ± 0,71	3	8	18a
Sustancia Vehículo 1	4,96 ± 0,11a	0	13a	14
Sustancia Vehículo 2	5,03 ± 0,25	1	12a	16a
Control Positivo (CF) ¹	4,01 ± 0,09*a	23**	63**a	271**a

CF (Ciclofosfamida). ¹Administración por vía intraperitoneal. ^aX ± D.E. de un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas. *p<0,05; ANOVA (comparación contra el control negativo en cada línea evaluada y sexo). ^b**p<0,01; prueba no paramétrica χ^2 (comparación contra el control negativo en cada línea evaluada y sexo). ^ap<0,05 (difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable, grupo experimental, prueba estadística y sexo. IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.

Al evaluar estas líneas en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide (Tabla 7); se obtuvo una concentración de espermatozoides espontánea en epidídimos en la línea BALB/c de $2,24-2,27 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Tras la inducción con CF se obtuvo una concentración de $0,34-1,34 \times 10^6$ espermatozoides/mL. En un conteo de 500 espermatozoides/animal se obtuvieron como promedio de forma espontánea de 483,2-489,3 espermatozoides normales y de 10,7-19,1 espermatozoides anómalos. Al inducir con CF, esta frecuencia de espermatozoides anómalos aumentó con valores de 94,2-106,8 espermatozoides con anomalías en la morfología de la cabeza, lo que evidencia la susceptibilidad de este biomodelo a las sustancias mutagénicas.

En la línea NMRI la concentración espermática normal estuvo entre $2,01-2,13 \times 10^6$ espermatozoides/mL y al administrar la CF esta concentración disminuyó a $0,93 \times 10^6$ espermatozoides/mL. En el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se obtuvieron resultados similares; se encontraron de 470,8-475,4 espermatozoides normales de un total de 500 y de 24,6-29,3 espermatozoides anómalos. En el grupo en el cual se administró la CF se obtuvo como promedio 93-105,4 espermatozoides anómalos y 394,6-407,0 espermatozoides normales.

En la línea OF-1 se observó una concentración espontánea de $2,13-2,16 \times 10^6$ espermatozoides/mL y al inducir daño con CF esta concentración bajó hasta $0,92 \times 10^6$ espermatozoides/mL, lo cual demuestra que este biomodelo es sensible al mutágeno.

Estos resultados de inducción son similares a los que se encontraron en la línea NMRI, pero se encuentran por encima de los obtenidos en la línea BALB/c, lo cual demuestra que esta última línea es más susceptible a la CF que las que se mencionaron anteriormente. En el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se obtuvieron resultados espontáneos de cabezas normales que oscilaron entre 472,8-476,2 y el número de cabezas anómalas fue de 23,8-27,2.

La CF indujo 86,2-108,6 cabezas anómalas como promedio en un conteo total de 500 espermatozoides. Los resultados espontáneos e inducidos de cabezas anómalas fueron inferiores al compararlos con la línea NMRI; pero al compararse los resultados de la línea OF-1 con la BALB/c se observó mayor cantidad de cabezas anómalas espontáneas y menor número de cabezas inducidas por la CF en la OF-1. De igual forma, los resultados del porcentaje de EGC fueron menores en la línea BALB/c y difieren con las otras líneas. En los ratones BALB/c este indicador de citotoxicidad en células germinales estuvo entre 3-5%.

Tabla 7. Comparación entre ratones machos BALB/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide y concentración espermática en epidídimos.

Grupos	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	Concentración* (10 ⁶) Células/mL	% EGC
Ratones BALB/c								
CN	489,32±5,83 b	10,72±5,83 b	6,20±5,7 b	1,20±1,77 b	2,01±3,8 b	0,30±1,5	2,27 ± 0,22 b	4,11±1,16 b
SV1	483,27±8,30	16,83±5,90	12,00±1,61	1,74±0,30	2,60±3,11 b	0,51±0,95	2,24 ± 0,26 b	3,90±1,95 b
SV2	487,62±3,75 b	12,47±3,75 b	7,16±5,20 b	1,71±1,20	3,12±2,73 b	0,52±0,26	2,25 ± 0,35 b	3,84±1,39 b
CF ^a	399,5±12,33*	100,51±6,33* b	39,10±6,84* b	22,10±3,76* b	29,90±6,18*	9,44±2,06* b	0,84 ± 0,55*	26,57±7,11* b
Ratones NMRI								
CN	475,44±4,60	24,60±4,60	13,11±4,58	1,30±0,54	10,00±2,68	0,30±0,34	2,13 ± 0,14	7,85±3,23
SV1	473,21±7,11	26,80±7,11	13,13±3,65	1,42±0,95	12,31±5,32	0,10±0,23	2,04 ± 0,21	6,52±4,11
SV2	470,80 ± 10,05	29,31 ± 5,09	12,60 ± 5,63	3,30 ± 3,47	12,91 ± 4,03	0,51 ± 0,28	2,01 ± 0,23	6,91±3,61
CF ^a	400,83 ± 6,26*	99,22 ± 6,26*	26,65 ± 7,59*	37,01 ± 3,19*	30,52 ± 7,33*	5,11 ± 0,64*	0,93 ± 0,30*	40,27±10,67*
Ratones OF-1								
CN	476,22±5,67	23,80±5,67	18,90±4,49	1,30±0,49	3,20±2,56	0,41±0,23	2,16 ± 0,31	8,33±2,87
SV1	474,17±8,46	25,90±8,46	19,44±3,53	1,41±0,85	4,81±5,26	0,31±0,11	2,13 ± 0,26	7,52±2,90
SV2	472,80±11,05	27,21±6,05	19,22±5,52	1,72±3,30	5,91±3,92	0,40±0,19	2,16 ± 0,37	6,41±3,70
CF ^a	402,69±11,26*	97,43±11,26*	46,62±8,52*	16,13±4,15*	27,44±8,31*	7,33±1,67*	0,92 ± 0,42*	39,81±11,41*
Ratones C57BL/6								
CN	473,14±6,87	26,90±6,87	21,20±5,10	1,20±0,38	4,03±4,36	0,50±0,16	2,11 ± 0,23	7,86±3,63
SV1	472,31±9,10	27,70±9,10	21,31±4,42	0,90±0,46	5,11±6,15	0,43±0,24	2,08 ± 0,33	8,10±2,94
SV2	471,22±5,62	28,84±5,62	22,04±3,28	1,01±0,41	5,62±4,80	0,23±0,29	2,05 ± 0,54	8,50±3,11
CF ^a	400,4±13,12*	99,61±13,12*	47,95±9,84*	14,60±5,23*	29,00±9,91*	8,14±3,19*	0,88 ± 0,10*	39,60±10,88*

CN: Control negativo. SV1: Sustancia vehículo 1. SV2: Sustancia vehículo 2. CF: Ciclofosfamida. ^aAdministración por vía i.p, durante 5 días. Determinaciones en 500 células/animal. *p<0,05 (comparación con el control negativo en la misma especie, ANOVA). **b**=p<0,05 (difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales).

EGC=Espermatozoides con gota citoplasmática.

En la línea C57BL/6 se observó una concentración espermática espontánea como promedio de $2,05-2,11 \times 10^6$ espermatozoides/mL, además se encontró que la CF indujo una disminución en la concentración a $0,78-0,98 \times 10^6$ espermatozoides/mL. En esta línea de ratón se observó como promedio de forma espontánea un número de cabezas anómalas entre 26,9-28,8; resultados que se encuentran por encima de los que se obtienen en las líneas BALB/c y OF-1, pero por debajo de los que se obtuvieron en la línea NMRI.

Al administrar la CF se encontró un promedio de espermatozoides anómalos de 86,5-112,7; resultados que al compararse con las líneas OF-1 y NMRI se encuentran por debajo en las mismas; pero al ser comparados con los inducidos por la CF en ratones BALB/c, en éstos la sensibilidad fue mayor; se obtienen en la línea BALB/c resultados mayores a los 100 espermatozoides promedio con anomalías visibles.

Al realizar una comparación entre líneas de ratones, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo cometa alcalino, se aprecia que hubo diferencias significativas entre la línea BALB/c en ambos sexos con las otras, no así entre las otras tres líneas evaluadas. Estos resultados se obtuvieron al comparar el porcentaje de nucleoides espontáneos e inducidos con CF en cada uno de los niveles de daño, al encontrarse en esta línea los niveles de daño espontáneos más bajos e inducidos aceptables, se destacó su sensibilidad a sustancias mutagénicas como lo es la CF (Mani y col., 1995; Porter y Singh, 1998; Matuo y col., 2007). En este ensayo se obtuvieron resultados similares a Marrero y col., (2007), en la línea de ratón NMRI, quienes reportaron valores de UA entre 59,50-69,75 y el porcentaje de células no dañadas estuvo entre 37,50-48,00 en ambos sexos. En el ensayo de micronúcleos se obtuvo como resultado que la línea BALB/c igualmente difirió con las otras tres líneas que se evaluaron en ambos sexos. Las diferencias estuvieron dadas en el índice de citotoxicidad por la relación eritrocitos policromáticos (EP)/eritrocitos normocromáticos (EN), el índice de genotoxicidad (% de EP que contienen micronúcleos), así como por el número de EP con 1, 2 o más de 2 micronúcleos, como índice de severidad del daño. En esta línea se obtuvieron los resultados espontáneos más bajos e inducidos más altos, se destaca la sensibilidad de este biomodelo animal para detectar compuestos clastogénicos.

Los resultados espontáneos e inducidos con dosis de CF de 50 mg/kg en ratones NMRI en el ensayo de MN, coinciden con los obtenidos por otros autores (Fraga y col., 2001; Remigio y col., 2001; Curbelo y col., 2013). Sin embargo, los valores espontáneos e inducidos con CF en ratones

BALB/c no coinciden con los obtenidos por Krishna y Hayashi, (2000) y Krishna y col., (2000), los cuales establecieron rangos espontáneos entre 0,9-3,1 e inducidos con 40 mg/kg de CF entre 8,8-42,1 % de EP con micronúcleos. De igual forma, los resultados obtenidos por Kissling y col., (2007), en ratones CD1 no difirieron para los machos en cuanto al porcentaje de EP con MN en ratones BALB/c, los valores obtenidos por estos autores fueron 0,13-0,27%, sin embargo los valores en esta misma línea en las hembras sí difirieron, pero coinciden con los obtenidos en ratones OF-1, NMRI y C57BL/6 en ambos sexos.

Por su parte, en el ensayo de aberraciones cromosómicas, útil para detectar *in vivo* sustancias que inducen aberraciones de tipo estructural en células de la médula ósea, nuevamente se encontraron diferencias significativas entre la línea BALB/c, en ambos sexos, con las otras líneas evaluadas. En la línea BALB/c se observaron los índices espontáneos más bajos e inducidos intermedios, teniendo en cuenta las células totales con aberraciones, número de aberraciones cromosómicas y/o cromatídicas, aberraciones del tipo *Gaps*, así como el número de células con poliploidías y el índice mitótico (variables numéricas) (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; Kramer, 2000).

La línea de ratones OF-1 también difirió de forma significativa de la C57BL/6, en esta última, se obtuvieron los valores espontáneos e inducidos más altos, siendo menos eficiente y sensible al daño citogenético (Tirunilai, 2012). Los resultados espontáneos encontrados en la línea de ratón NMRI coinciden con los reportados por Gutiérrez y col., (2012); que obtuvieron resultados de 6-10 células totales con aberraciones en esta línea de ratón. Además, los datos espontáneos en ratones BALB/c coinciden con los reportados por Gerasimova y Topashka-Ancheva; (2009), en la línea isogénica ICR, con un porcentaje de células con aberraciones de 1,2 (12 células totales con aberraciones).

Los resultados espontáneos que se encontraron concuerdan para el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas para las líneas BALB/c y NMRI, según los índices de daños espontáneos declarados por otros autores (Hayashi y col., 1994; Tice y col., 1994; Adler y col., 1998; Alamone, 1999; Kirkland y col., 2005; Yiqiang y col., 2005; Recio y col., 2010; Mazumdar y col., 2011, Carvalho y col., 2011; Reddy y col., 2011; LeBaron y col., 2013), además concuerdan con los que se encontraron en los grupos controles negativos de estudios realizados por (Fernández y col., 2005; Gutiérrez y col., 2012). Para el caso de los ratones de las líneas OF-1 y C57BL/6 aún no se declaran los daños espontáneos e inducidos con mutágenos, sin embargo, se

utilizan como biomodelos en ensayos de genotoxicidad *in vivo* (Betancourt y col., 1998).

Al realizar una comparación entre estas cuatro líneas en ratones machos, en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, se obtuvo que la línea más eficiente nuevamente fue la BALB/c. Esta línea difirió de forma significativa de las otras líneas evaluadas, teniendo en cuenta, que en la misma se obtuvieron los valores más altos de concentración espermática espontánea como índice de citotoxicidad y los valores más bajos de anomalías en la cabeza del espermatozoide como indicador de daño genotóxico.

Los resultados basales en ratones C57BL/6 coincidieron con los reportados por Wyrobek y Bruce, (1978); Krzanowska, (1981), Wyrobek y col., (1983), mientras que los resultados espontáneos e inducidos en ratones de la línea BALB/c no coinciden con los reportados por Aduloju y col., (2008), los que establecieron en esta línea de ratón resultados de 5,05% de anomalías en la cabeza del espermatozoide, que según el número total de células analizadas corresponden a un total de 30,85 espermatozoides anómalos como promedio, los cuales son superiores a los obtenidos.

Krzanowska, (1981), estudió la correlación entre la edad y las diferentes líneas de ratones C57BL/6, BALB/c y KE, con las morfologías de la cabeza del espermatozoide. Las anomalías morfológicas de la cabeza del espermatozoide fueron dependientes de la edad y de la línea evaluada, además, en la línea de ratones BALB/c se obtuvo mayor porcentaje de espermatozoides normales, resultados que coincidieron con otros autores (Mori, 1961; Krzanowska, 1976; Phillips y Dryden, 1991).

Liu y col., (2009), compararon la susceptibilidad de tres líneas de ratones machos endogámicos (C57BL/6, DBA/2, BALB/c), a la exposición del 1-Bromopropano y como resultado obtuvieron que la respuesta a este producto dependió de la línea genética, pues diferían en la susceptibilidad, a través de la medición de los niveles de la CYP2E1 hepática, la actividad del glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reducido (GSH), y los niveles de expresión del grupo hemo NAD (P) H: quinona oxidoreductasa (NQO1) y oxigenasa-1 (HO-1). En este mismo estudio se demostró que la línea de ratones BALB/c fue la más sensible, aunque las tres líneas de ratones fueron igualmente susceptibles en el conteo de espermatozoides y la motilidad de los espermatozoides, pero este último fue menor en los ratones BALB/c que en las otras dos líneas evaluadas.

Hayashi y col., (2011), consideran que los resultados que se obtienen en una base de datos, solo

es aceptable la comparación con los resultados de bases de datos internos, si se tienen en cuenta, los mismos tiempos de tratamientos, o conductas similares de tratamiento, si alternativamente se analiza la misma cantidad de células, si se tienen en cuenta para realizar las bases de datos todos los resultados e incluso, aquellos que se encuentran fuera de rango, en la misma especie o línea animal. La valoración debe ser considerada como un proceso de dos pasos: primero, una comparación de los datos experimentales con el control negativo del ensayo realizado y segundo, una consideración de si los resultados son significativos, cuando se comparan con la distribución de los datos históricos propios (Hayashi y col., 2011).

Estas consideraciones se tuvieron en cuenta para analizar las diferencias significativas encontradas en esta investigación y los resultados de otros autores con los cuales se comparó y se discutió en este experimento.

Hayashi y col., (2011), plantean que los resultados obtenidos de las bases de datos deben ser provenientes de un mínimo de 10 experimentos de los controles negativos y positivos, pues se toman resultados que se realizaron en diferentes tiempos, en diferentes años y a diferentes condiciones ambientales y de manejo, los cuales tienden a aumentar la desviación estándar, causa por la cual, los autores establecen un número elevado de resultados, siendo como óptimo 20 investigaciones. En este caso no es necesario este número elevado de resultados, si se tiene en cuenta, el hecho de haber administrado y evaluado los índices espontáneos e inducidos en los diferentes ensayos y en las diferentes líneas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones experimentales, por lo general, debe aumentar la robustez de los resultados y disminuir la variabilidad.

El resultado obtenido, que sustenta que los ratones BALB/c son los más sensibles entre las líneas comparadas, no establece para nada un criterio de obligación a realizar los ensayos de genotoxicidad *in vivo* en esta línea en particular, pero constituye un punto importante a declarar o discutir a la hora de realizar un diseño experimental en estudios de este tipo, sobre todo, cuando los ensayos de genotoxicidad *in vitro* han sido positivos al daño y los *in vivo* en otra línea de roedor han resultado negativos. Una estrategia sería utilizar una línea más sensible, por lo que la utilidad de estos resultados va encaminada a la clasificación de sustancias poco genotóxicas, que son las más difíciles de determinar, cuando las evidencias estadísticas enmascaran la posible genotoxicidad del producto evaluado.

Conclusiones parciales

1. Los resultados obtenidos en la línea de ratones BALB/c difieren significativamente de las otras líneas evaluadas, donde se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos aceptables con ciclofosfamida.
2. En la línea C57BL/6 se obtuvieron los índices de daño al ADN espontáneos e inducidos más altos, siendo la menos eficiente.

4.1.2. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre ratas de ambos sexos de las líneas Sprague Dawley, Lewis y Wistar

El hecho de observarse el daño en células somáticas y germinales evidencia que las dosis, vía y número de exposiciones fueron las apropiadas para no lograr daño sistémico, al no observarse animales con signos y síntomas indicativos de toxicidad.

En la Tabla 8 se observa que en las tres líneas de ratas que se evaluaron en el ensayo cometa alcalino, los resultados difirieron entre los grupos controles negativos, sustancias vehículos 1 y 2 con los resultados que se obtuvieron con el uso de la CF. Por otro lado, se observó menor número de daño al ADN espontáneo en la línea de ratas SD en ambos sexos; en la cual se obtuvo un porcentaje de nucleoides con grado 0 en un rango entre 69,11-87,31 en los machos.

De igual forma, difirieron los resultados de la longitud de migración del ADN entre las ratas SD en ambos sexos y las otras tres líneas evaluadas, al experimentar las ratas SD la menor longitud de migración del ADN, indicador que es proporcional a la rotura de las cadenas de ADN (Collins, 2004), por tanto, se infiere que de forma espontánea las ratas SD son más resistentes a este tipo de daño.

Los resultados de inducción obtenidos con la CF no difirieron entre líneas en ambos sexos. Además, se puede apreciar que en las tres líneas de ratas evaluadas la CF indujo un aumento de nucleoides de grado 1 y 2, y en menor porcentaje de grado 3 y 4, lo cual permite caracterizar el efecto mutagénico de la CF en este ensayo *in vivo*.

Los resultados espontáneos que se obtuvieron en ratas SD en el ensayo cometa de leucocitos de sangre periférica concuerdan con los obtenidos por González y col., (2002), los cuales establecieron valores de longitud de daño al ADN en el control negativo como promedio de 51,9 μm . Además, los valores encontrados en ratas SD concuerdan con el número de UA declaradas por Narumi y col., (2014), con valores entre 25,3-46,1 UA. Sin embargo, la longitud de daño o de

Tabla 8. Comparación entre ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos al utilizarse como biomodelos en el ensayo cometa alcalino, según inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos	Sexo	LM-ADN (μm)	Unidades Arbitrarias	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
				(% Nucleoides)				
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos								
Control Negativo	H	48,41 \pm 2,91a	34,80 \pm 10,24a	79,14 \pm 4,32a	11,86 \pm 5,02a	5,37 \pm 3,10a	2,32 \pm 1,01a	1,31 \pm 1,00a
	M	47,63 \pm 3,10a	33,46 \pm 7,51a	80,10 \pm 5,22a	11,23 \pm 5,56a	5,00 \pm 2,89a	2,45 \pm 1,20a	1,22 \pm 0,98a
Sustancia Vehículo 1	H	49,32 \pm 3,02a	32,56 \pm 10,20a	80,32 \pm 7,83a	11,11 \pm 4,28a	5,25 \pm 2,99a	2,33 \pm 1,73a	0,99 \pm 0,34a
	M	46,56 \pm 2,84a	35,03 \pm 8,90a	78,21 \pm 9,10a	13,19 \pm 4,77a	4,98 \pm 2,33a	2,60 \pm 1,26a	1,02 \pm 0,83a
Sustancia Vehículo 2	H	48,68 \pm 1,99a	33,19 \pm 10,31a	80,46 \pm 6,59a	10,78 \pm 5,11a	5,17 \pm 3,15a	2,29 \pm 1,51a	1,30 \pm 0,99a
	M	47,70 \pm 3,54a	33,44 \pm 7,62a	79,75 \pm 3,83a	12,19 \pm 4,99a	4,96 \pm 2,51a	2,07 \pm 1,65a	1,28 \pm 1,01a
Control Positivo (CF) ¹	H	72,13 \pm 6,92*a	101,45 \pm 13,28*a	35,56 \pm 3,55*a	43,47 \pm 3,44*a	10,31 \pm 3,91*	6,08 \pm 2,80*	4,78 \pm 2,46*
	M	71,81 \pm 5,66*a	106,83 \pm 14,11*	32,76 \pm 4,88*a	44,67 \pm 4,77*	10,56 \pm 3,68*	7,00 \pm 2,00*	5,01 \pm 2,51*
Ratas Lewis de ambos sexos								
Control Negativo	H	60,94 \pm 5,92	74,77 \pm 13,50	56,21 \pm 2,32	25,85 \pm 3,10	8,81 \pm 1,20	5,22 \pm 1,52	3,91 \pm 0,86
	M	63,28 \pm 4,11	69,99 \pm 15,20	58,85 \pm 1,89	23,98 \pm 2,77	8,93 \pm 2,00	4,81 \pm 2,01	3,43 \pm 0,60
Sustancia Vehículo 1	H	63,59 \pm 3,99	71,57 \pm 14,30	57,12 \pm 2,20	25,45 \pm 3,22	9,02 \pm 2,12	5,56 \pm 0,96	2,85 \pm 0,99
	M	61,60 \pm 4,46	72,03 \pm 11,55	55,30 \pm 2,82	28,49 \pm 2,67	8,10 \pm 1,92	5,10 \pm 1,00	3,01 \pm 0,51
Sustancia Vehículo 2	H	63,10 \pm 4,27	71,57 \pm 12,69	54,80 \pm 3,29	29,91 \pm 2,09	7,52 \pm 3,05	4,74 \pm 2,62	3,10 \pm 1,20
	M	60,88 \pm 4,41	69,86 \pm 13,77	55,31 \pm 3,11	29,56 \pm 3,02	8,08 \pm 2,99	4,10 \pm 2,83	2,96 \pm 1,33
Control Positivo (CF) ¹	H	86,52 \pm 8,68*	112,68 \pm 22,29*	27,10 \pm 4,15*	50,00 \pm 5,14*	11,00 \pm 5,81*	6,92 \pm 3,60*	4,98 \pm 4,26*
	M	85,13 \pm 9,08*	110,24 \pm 21,73*	26,76 \pm 4,88*	51,17 \pm 5,22*	11,10 \pm 4,99*	7,01 \pm 3,10*	3,96 \pm 5,32*
Ratas Wistar de ambos sexos								
Control Negativo	H	64,10 \pm 4,56	79,19 \pm 9,62	55,11 \pm 2,32	26,10 \pm 2,80	7,99 \pm 1,31	6,09 \pm 1,12	4,71 \pm 0,21
	M	65,08 \pm 3,88	73,23 \pm 11,23	57,10 \pm 2,20	24,92 \pm 2,05	9,16 \pm 1,55	5,29 \pm 1,72	3,53 \pm 0,23
Sustancia Vehículo 1	H	63,66 \pm 4,35	68,98 \pm 17,13	57,85 \pm 1,83	24,99 \pm 4,10	9,77 \pm 2,01	5,11 \pm 1,23	2,28 \pm 1,33
	M	64,42 \pm 5,05	68,19 \pm 13,38	56,50 \pm 1,12	29,10 \pm 1,88	7,21 \pm 2,10	4,09 \pm 2,26	3,10 \pm 0,13
Sustancia Vehículo 2	H	62,41 \pm 4,01	73,46 \pm 10,36	55,77 \pm 2,56	28,11 \pm 3,29	6,85 \pm 3,99	5,43 \pm 2,07	3,84 \pm 0,81
	M	63,82 \pm 4,60	69,56 \pm 11,93	54,11 \pm 4,21	30,86 \pm 2,55	8,88 \pm 2,01	3,66 \pm 2,83	2,49 \pm 2,20
Control Positivo (CF) ¹	H	85,88 \pm 9,41*	111,63 \pm 21,18*	26,77 \pm 4,66*	49,87 \pm 5,90*	11,90 \pm 4,93*	7,88 \pm 2,40*	3,58 \pm 4,85*
	M	85,21 \pm 7,82*	111,80 \pm 22,11*	27,23 \pm 4,33*	50,05 \pm 5,88*	10,52 \pm 5,20*	8,09 \pm 2,66*	4,11 \pm 4,99*

CF (Ciclofosfamida), ¹Administración por vía i.p. *p<0,05 (comparación contra el control negativo en la misma línea genética, test de U de Mann Whitney). a=p<0,05 (difere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, test de U de Mann Whitney). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales). LM: Longitud de migración del ADN. H: Hembras. M: Machos.

migración del ADN no concuerda en ratas machos SD con Mohammad y col., (2008), en el control negativo la longitud de daño fue de 101-122 μm , resultados que son el doble de los que se obtienen espontáneamente en esta investigación. Los resultados de la longitud de daño al ADN en ratas Wistar tampoco concuerdan con los reportados por Wu y col., (2006), los que plantean longitudes de daño entre 9,09-11,73 μm .

En las Tablas 9 y 10 se muestran los resultados del ensayo de micronúcleos en médula ósea. La CF difirió nuevamente en las tres líneas de ratas evaluadas. El menor resultado espontáneo de citotoxicidad dado por la relación EP/EN se obtuvo en la línea de ratas SD en ambos sexos, estos resultados se encuentran dentro de los rangos declarados internacionalmente al utilizar esta línea de rata en estudios de genotoxicidad y antigenotoxicidad (Gocke y col., 2009); además difirieron de forma significativa entre esta línea y las ratas Lewis y Wistar.

En la línea SD los resultados de citotoxicidad se encuentran entre 1,12-1,24 y el índice de genotoxicidad estuvo entre 0,09-0,21 % de eritrocitos policromáticos con micronúcleos, el cual difirió con las otras líneas de ratas evaluadas. Igualmente, la respuesta de esta línea de rata a la CF fue alta, pero menor a los resultados de clastogenicidad que se obtuvieron en las líneas Lewis y Wistar en ambos sexos.

Los resultados espontáneos del total de MN en ratas SD fueron bajos al compararse con las otras líneas evaluadas y en ambos sexos, estando en un rango entre 22-32 MN totales. Por otra parte, la CF indujo un número considerable de MN en esta línea de ratas, pero su mayor efecto clastogénico se logró en los machos de la línea Wistar, resultados que concuerdan con varios autores que destacan la sensibilidad de ratas Wistar a clastógenos químicos (Zúñiga y col., 1996; 2001; Gocke y col., 2009). En este experimento tampoco se observaron diferencias significativas entre sexos y fue baja la variabilidad de los resultados dentro de una misma línea de ratas, lo cual está en conjunción con los estudios que realizó Zúñiga y col., (2001).

Un estudio que realizaron Krishna y col., (2000), en el ensayo de micronúcleos en ratas Wistar reportó valores más altos, tanto en los índices espontáneos tratados con sustancias vehículos como los índices de EP con MN en animales tratados con CF, los cuales difieren para todas las líneas de ratas utilizadas en este ensayo, los valores espontáneos estuvieron entre 1,3-5,3% de EP con MN, en cambio la CF indujo de 10,4-33,8 % de EP con MN (Krishna y col., 2000). Sin embargo, los resultados no difieren con Kissling y col., (2007), en cuanto a los obtenidos

Tabla 9. Comparación en el número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos.

Grupos	Sexo	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos					
Control negativo	H	1086 ± 16,91	914 ± 16,91 ^a	1,19 ± 0,06 ^a	0,22 ± 0,01
	M	1092 ± 12,33 ^a	908 ± 12,33 ^a	1,20 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,05 ^a
Sustancia vehículo 1	H	1095 ± 11,75 ^a	905 ± 11,75 ^a	1,21 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,02 ^a
	M	1088 ± 13,20	912 ± 13,20 ^a	1,19 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,02 ^a
Sustancia vehículo 2	H	1084 ± 14,62	916 ± 14,62	1,18 ± 0,04	0,17 ± 0,05 ^a
	M	1082 ± 17,51	918 ± 17,51	1,18 ± 0,06	0,15 ± 0,06 ^a
Control positivo (CF) ¹	H	940 ± 12,58* ^a	1060 ± 12,58* ^a	0,89 ± 0,04*	1,74 ± 1,03* ^a
	M	946 ± 10,37* ^a	1054 ± 10,37* ^a	0,90 ± 0,03* ^a	1,68 ± 0,92* ^a
Ratas Lewis de ambos sexos					
Control negativo	H	1052 ± 9,81	948 ± 9,81	1,11 ± 0,02	0,33 ± 0,05
	M	1044 ± 7,56	956 ± 8,10	1,09 ± 0,03	0,32 ± 0,06
Sustancia vehículo 1	H	1058 ± 8,89	942 ± 10,05	1,12 ± 0,02	0,34 ± 0,06
	M	1063 ± 6,10	937 ± 12,09	1,13 ± 0,02	0,34 ± 0,05
Sustancia vehículo 2	H	1049 ± 9,53	951 ± 10,04	1,10 ± 0,03	0,29 ± 0,07
	M	1061 ± 9,98	939 ± 11,12	1,13 ± 0,02	0,30 ± 0,07
Control positivo (CF) ¹	H	903 ± 7,53*	1097 ± 7,53*	0,82 ± 0,02*	2,03 ± 1,48*
	M	896 ± 8,10*	1104 ± 8,10*	0,81 ± 0,02*	2,00 ± 1,08*
Ratas Wistar de ambos sexos					
Control negativo	H	1056 ± 10,23	944 ± 10,23	1,12 ± 0,03	0,37 ± 0,02
	M	1066 ± 6,86	934 ± 7,09	1,14 ± 0,02	0,34 ± 0,04
Sustancia vehículo 1	H	1048 ± 8,42	952 ± 8,42	1,10 ± 0,03	0,34 ± 0,05
	M	1050 ± 9,04	950 ± 8,01	1,11 ± 0,03	0,38 ± 0,03
Sustancia vehículo 2	H	1041 ± 9,53	959 ± 10,04	1,10 ± 0,03	0,35 ± 0,03
	M	1057 ± 9,71	943 ± 9,71	1,12 ± 0,04	0,32 ± 0,05
Control positivo (CF) ¹	H	884 ± 10,82*	1116 ± 5,13*	0,79 ± 0,03*	2,01 ± 1,56*
	M	889 ± 7,20*	1111 ± 7,20*	0,80 ± 0,02*	2,05 ± 1,16*

CF (Ciclofosfamida). ¹Administración por vía i.p. Determinaciones en 2 000 células/animal. *p<0,05 (comparación con el control negativo en la misma línea genética, ANOVA). ^ap<0,05 (difere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales). H: Hembras. M: Machos. EP: Eritrocitos policromáticos. EN: Eritrocitos normocromáticos. MN: Micronúcleos.

Tabla 10. Comparación del número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos.

Grupos	Sexo	MN	EP (1 MN)	EP (2 MN)	EP (+2 MN)
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos					
Control negativo	H	32	24	7	1
	M	27 ^a	20 ^a	6	1
Sustancia vehículo 1	H	29 ^a	25	4 ^a	0
	M	30 ^a	26	3 ^a	1
Sustancia vehículo 2	H	25 ^a	19 ^a	5 ^a	1
	M	22 ^a	16 ^a	5 ^a	1
Control positivo (CF) ¹	H	250* ^a	158* ^a	80* ^a	12* ^a
	M	241* ^a	152* ^a	73* ^a	16* ^a
Ratas Lewis de ambos sexos					
Control negativo	H	48	33	13	2
	M	47	30	15	2
Sustancia vehículo 1	H	49	36	10	3
	M	50	40	8	2
Sustancia vehículo 2	H	42	28	11	3
	M	44	29	13	2
Control positivo (CF) ¹	H	295*	179*	95*	21*
	M	291*	174*	90*	27*
Ratas Wistar de ambos sexos					
Control negativo	H	54	35	16	3
	M	49	29	18	2
Sustancia vehículo 1	H	50	39	9	2
	M	55	43	11	1
Sustancia vehículo 2	H	51	36	13	2
	M	46	30	12	4
Control positivo (CF) ¹	H	292*	175*	92*	25*
	M	298*	173*	96*	29*

CF (Ciclofosfamida). ¹Administración por vía ip. Determinaciones en 2 000 EP/animal. *p<0,01 (comparación con el control negativo en la misma línea genética, prueba no paramétrica de χ^2 , para las dos series experimentales). ^ap<0,05 (difiere al comparar entre líneas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, para la misma prueba estadística que el anterior). H: Hembras. M: Machos. EP: Eritrocitos policromáticos. MN: Micronúcleos.

espontáneamente en la misma línea de rata evaluada, Kissling y col., (2007), evaluaron las diferencias inter-animal e inter-laboratorio en ratas SD, en cuanto al porcentaje de EP con MN y obtuvieron valores de 0,17-0,29% de EP con MN.

Los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas (Tabla 11) demuestran, una vez más, el uso de ratas SD como biomodelo sensible en los ensayos de genotoxicidad. Las aberraciones de tipo estructural difirieron entre las ratas SD en ambos sexos al compararse con las líneas Lewis y Wistar. Se obtuvieron los resultados espontáneos más bajos de células con aberraciones en ratas SD; estando en el rango entre 17-23 y la CF indujo en esta línea de ratas entre 220-246 células totales con aberraciones. Aunque el mayor efecto mutagénico de la CF, se logró en la línea de ratas Lewis, al inducir entre 342-360 células aberradas estructuralmente.

Por otra parte, difirieron los índices mitóticos obtenidos entre la línea SD y las otras evaluadas, como parámetro fundamental de daño citotóxico. En la línea de ratas SD se obtuvieron los resultados de índice mitótico más altos, estando en el rango de 4,81-5,29 % y el menor número de células con poliploidía (1-3) como parámetro de aberraciones de tipo numérico, así como el menor número de aberraciones de tipo *Gaps* (4-8); parámetros que difirieron entre esta línea y las otras evaluadas en ambos sexos. Tanto en la línea SD, como en la Wistar y Lewis, la CF indujo altos índices de citotoxicidad y genotoxicidad. En la línea de ratas Wistar llegó a inducir la formación de 45-48 metafases con poliploidía y de 99-100 células con aberraciones tipo *Gaps*. Además, en esta misma línea de ratas fue capaz de disminuir el porcentaje de células en metafase (IM), entre 2,93-3,02% con respecto a la línea Lewis.

Los resultados de aberraciones cromosómicas endógenas e inducidas en ratas SD no difieren con los índices que se establecen internacionalmente (Tice y col., 1994; Gocke y col., 2009; Recio y col., 2010). Sin embargo, no concuerdan con Rivero y col., (2012), que plantean valores totales de aberraciones en 500 células analizadas entre 0,12-1,08, que corresponden a 500 células por grupo para un solo sexo.

Tampoco concuerdan con Curbelo y col., (2013), quienes establecieron valores de células totales con aberraciones entre 1,11-2,77 en ratas SD en el grupo control negativo de un diseño experimental, donde evaluaron la genotoxicidad de varios pesticidas y fertilizantes orgánicos. Los obtenidos en esta línea de ratas fueron de 3,5 células totales con aberraciones como promedio, que corresponde a valores entre 18-23 células con aberraciones totales en un grupo experimental.

Tabla 11. Comparación de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos.

Grupos	Sexo	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	Aberraciones/1 000 células/grupo ^b				# de Células con aberraciones ^b
					Cromosómicas		Cromatídicas		
					Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos									
Control Negativo	H	4,81 ± 0,10c	1c	5c	0	0	11c	7c	18c
	M	4,93 ± 0,09c	2c	6c	0	0	12c	5c	17c
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	3,40 ± 0,26*	28**c	69**c	12**c	25**c	168**c	41**c	246**c
	M	3,58 ± 0,43*c	23**c	62**c	13**c	20**c	151**c	36**c	220**c
Sustancia Vehículo 1	H	4,97 ± 0,21c	3c	8c	0	0	10c	9c	19c
	M	5,12 ± 0,18	2c	7c	0	0	13c	6c	18c
Sustancia Vehículo 2	H	5,19 ± 0,32c	1c	6c	0	0	14c	6c	20c
	M	5,29 ± 0,25c	3c	4c	0	0	15c	8c	23c
Ratas Lewis de ambos sexos									
Control Negativo	H	4,38 ± 0,11	7	16	0	0	26	24	50
	M	4,41 ± 0,10	10	17	0	0	33	19	52
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	2,99 ± 0,11*	42**	90**	33**	49**	192**	68**	342**
	M	3,10 ± 0,13*	40**	96**	39**	46**	201**	74**	360**
Sustancia Vehículo 1	H	4,33 ± 0,15	13	19	0	0	23	28	51
	M	4,51 ± 0,09	16	20	0	0	35	20	55
Sustancia Vehículo 2	H	4,47 ± 0,16	19	18	0	0	38	19	57
	M	4,60 ± 0,08	24	20	0	0	40	20	60
Ratas Wistar de ambos sexos									
Control Negativo	H	4,32 ± 0,13	9	20	0	0	30	25	55
	M	4,37 ± 0,11	16	22	0	0	35	16	51
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	H	2,93 ± 0,09*	48**	99**	36**	46**	185**	72**	339**
	M	3,02 ± 0,10*	45**	100**	43**	40**	193**	78**	354**
Sustancia Vehículo 1	H	4,26 ± 0,16	18	21	0	0	26	27	53
	M	4,40 ± 0,10	19	18	0	0	37	21	58
Sustancia Vehículo 2	H	4,42 ± 0,14	22	23	0	0	42	17	59
	M	4,55 ± 0,10	22	18	0	0	37	24	61

^aX ± D.E, De un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas, *p<0,05; ANOVA.

^b**p<0,01; prueba no paramétrica χ^2 (comparación contra el control negativo para ambas pruebas, en la misma línea genética).

c=comparación entre líneas genéticas teniendo en cuenta el análisis estadístico en las mismas variables. H: Hembras. M: Machos. IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.

La Tabla 12 muestra los resultados del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, al evaluar ratas machos SD, Lewis y Wistar.

En las ratas SD se observaron valores de espermatozoides normales espontáneos entre 455,3-460,3, de igual forma, el número de espermatozoide anómalos espontáneos estuvo en intervalos entre 39,4-44,7 en 500 células registrables. Las formas predominantes de anomalías en la cabeza del espermatozoide fueron las de tipo amorfo, con intervalos entre 14,3-18,4. En esta línea de ratas se obtuvo una concentración basal entre $1,97-2,18 \times 10^6$ células/mL y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática fue de 6,4-8,9 como promedio. Los valores de anomalías en la cabeza del espermatozoide encontradas coinciden con Trivedi y col., (2010), quienes obtuvieron resultados similares a los establecidos para la línea SD.

En el grupo que se administró la CF estos valores fueron más altos, difiriendo significativamente con los controles (Prueba de ANOVA, $p < 0,05$), la CF logró inducir hasta 92,0 espermatozoides anómalos en 500 células registrables, las morfoanomalías predominantes fueron en forma de banana (30,0 como promedio) y sin gancho (30,5 como promedio). La concentración espermática bajó hasta $0,81 \times 10^6$ células/mL y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática fue en el orden del 43,2 % como promedio

Al evaluar ratas Lewis se observaron valores de espermatozoides normales espontáneos entre 424,9-432,4, de igual forma el número de espermatozoide anómalos espontáneos estuvo en intervalos entre 67,6-75,1 en 500 células registrables. Las formas predominantes de anomalías en la cabeza del espermatozoide fueron las de tipo amorfo con intervalos entre 22,1-25,9, unido a las formas de banana con intervalos entre 19,6-24,1. En esta línea de rata se obtuvo una concentración basal entre $1,81-1,90 \times 10^6$ células/mL y el % de espermatozoide con gota citoplasmática fue de 10,6-14,1 como promedio.

Para el grupo tratado con CF estos valores fueron más altos, difiriendo significativamente con los controles (Prueba de ANOVA, $p < 0,05$), la CF logró inducir hasta 127,9 espermatozoides anómalos en 500 células registrables, las anomalías predominantes fueron en forma de banana (42,8 como promedio) y sin gancho (43,9 como promedio). La concentración espermática bajó hasta $0,63 \times 10^6$ células/mL y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática fue en el orden del 60,6 % como promedio

Las ratas Wistar experimentaron valores espontáneos de cabezas de espermatozoides normales,

Tabla 12. Comparación en la morfología de la cabeza del espermatozoide, % de espermatozoides con gota citoplasmática y concentración espermática en epidídimos de ratas machos Sprague Dawley, Lewis y Wistar.

Grupos	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	% EGC	Concentración ^a (10 ⁶) células/mL
Ratas Sprague Dawley								
CN	460,42 ± 19,43a	39,60 ± 10,40a	14,31 ± 4,36a	10,40 ± 8,22a	13,70 ± 6,86a	1,20 ± 0,77a	7,51 ± 2,37a	2,18 ± 0,53a
SV1	460,60 ± 8,35a	39,40 ± 8,38a	16,61 ± 6,64a	9,32 ± 4,43a	11,81 ± 3,71a	1,71 ± 0,90	6,42 ± 3,24a	2,09 ± 0,37a
SV2	455,30 ± 17,58	44,71 ± 13,53a	18,40 ± 3,84	11,42 ± 7,96a	12,61 ± 6,10a	2,30 ± 1,73	8,92 ± 4,10	1,97 ± 0,27
CF ^a	408,02 ± 7,08*a	92,01 ± 7,07*a	27,62 ± 8,01*a	30,01 ± 2,97*a	30,50 ± 7,04*a	3,93 ± 0,56*a	43,23 ± 6,12*a	0,81 ± 0,32*a
Ratas Lewis								
CN	430,70 ± 9,26	69,30 ± 9,25	22,10 ± 3,10	23,90 ± 7,67	20,61 ± 9,26	2,70 ± 0,54	10,66 ± 6,18	1,81 ± 0,45
SV1	432,41 ± 7,84	67,61 ± 7,82	23,63 ± 3,95	19,61 ± 10,11	21,52 ± 7,36	2,90 ± 0,46	11,88 ± 5,90	1,90 ± 0,26
SV2	424,90 ± 8,10	75,11 ± 8,17	25,90 ± 1,56	24,12 ± 6,42	22,12 ± 8,78	3,00 ± 0,4	14,14 ± 7,60	1,86 ± 0,21
CF ^a	372,12 ± 6,63*	127,94 ± 6,67*	36,24 ± 9,73*	42,82 ± 7,29*	43,93 ± 10,01*	5,01 ± 0,74*	60,61 ± 8,24*	0,63 ± 0,30*
Ratas Wistar								
CN	428,60 ± 7,90	71,40 ± 7,98	22,60 ± 2,84	22,80 ± 8,19	23,10 ± 9,55	2,90 ± 0,64	11,75 ± 5,24	1,79 ± 0,30
SV1	433,91 ± 8,83	66,10 ± 8,82	23,00 ± 4,26	20,10 ± 8,72	19,91 ± 8,14	3,15 ± 0,55	12,33 ± 4,95	1,89 ± 0,38
SV2	425,12 ± 9,37	74,92 ± 9,33	25,10 ± 2,35	23,90 ± 7,61	22,62 ± 9,14	3,30 ± 0,48	14,57 ± 6,25	1,81 ± 0,24
CF ^a	369,20 ± 4,25*	130,81 ± 4,26*	37,02 ± 5,57*	45,23 ± 6,95*	43,10 ± 9,86*	5,51 ± 0,39*	62,10 ± 9,77*	0,60 ± 0,30*

CN: Control negativo. SV1: Sustancia vehículo 1. SV2: Sustancia vehículo 2. CF: Ciclofosfamida. EGC: Espermatozoides con gota citoplasmática. ^a Administración por vía i.p, durante 5 días. Determinaciones en 500 células/animal. *p<0,05 (comparación con el control negativo en la misma cepa, ANOVA). a=p<0,05 (difiere al ser comparados los resultados entre cepas teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales).

entre 425,1-433,9 como promedio, y los espermatozoides anómalos estuvieron entre 66,1-74,9 en 500 células registrables. Estos resultados concuerdan con Shetty, (2007); quien obtuvo en sus controles negativos 446,8 espermatozoides normales y 7,8 anómalos como promedio. Sin embargo, difieren con los encontrados por Laxminarayana y col., (2010), los cuales obtuvieron como promedio valores de espermatozoides anómalos en ratas Wistar entre 15-25.

Las anomalías morfológicas predominantes en el presente estudio fueron: los amorfos de 22,6-25,1, en forma de banana de 20,1-23,9 y por último, espermatozoides sin gancho de 19,9-23,1. El % de espermatozoides con gota citoplasmática endógenos estuvieron en el rango entre 11,7-14,5 como promedio. En tanto, la concentración espermática encontrada estuvo entre 1,79-1,89x10⁶ células/mL.

En esta línea de rata la CF indujo valores de espermatozoides anómalos en el orden de los 126,6-135,0 en 500 células registrables. Las morfoanomalías inducidas predominantes fueron las formas de bananas con valores de 45,2 y espermatozoides sin gancho con valores de 43,1. La CF indujo en ratas Wistar hasta 62,1% de espermatozoides con gota citoplasmática y la concentración de espermatozoides disminuyó considerablemente hasta 0,30-0,90x10⁶ células/mL. Para el caso de la CF tampoco coincidieron los resultados con Shetty, 2007, ya que este autor obtuvo valores medios de espermatozoides normales de 188,8, en 500 células contables.

Al realizar una comparación entre líneas se obtuvo que las ratas SD, presentaron los valores espontáneos más bajos de anomalías en la cabeza del espermatozoide y del porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática, así como la mayor concentración espermática endógena, difiriendo significativamente con las otras líneas (Prueba de ANOVA, p<0,05). En tanto, la línea Lewis presentó los valores más altos de espermatozoides anómalos y la Wistar los valores más altos del porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática y los más bajos de concentración espermática, sin diferir entre ellas (Prueba de ANOVA, p<0,05). La línea de ratas Wistar resultó ser la más susceptible al mutágeno utilizado, mostrando los valores más altos de espermatozoides anómalos con gota citoplasmática y los valores más bajos de concentración espermática. Por otro lado la línea Lewis presentó los resultados más altos de espermatozoides anómalos y la Wistar los valores más altos del porcentaje de espermatozoide con gota citoplasmática y los más bajos de concentración espermática, sin diferir entre ellas (Prueba de ANOVA, p<0,05).

En estudios previos se demostró que las diferentes líneas de ratas difieren entre sí, en cuanto a las tasas de daño en variables bioquímicas, hematológicas, así como en el metabolismo de xenobióticos y de metales pesados (Alemán y col., 1997; Gonzales y col., 2001; 2003; Yucra y col., 2008; Recio y col., 2008).

Las ratas SD son muy útiles en los ensayos de genotoxicidad y de toxicología de la reproducción; se utilizan como biomodelos en ensayos de fertilidad y teratogénesis, por presentar bajas tasas de anomalías en la cabeza del espermatozoide, así como un amplio conocimiento de sus patologías congénitas espontáneas (Shayne, 2007).

Es una ventaja del presente estudio obtener como resultado que las ratas SD experimentaron menores índices de daño en el ensayo evaluado, con cierto grado de susceptibilidad a la CF, ya que en este tipo de línea se obtiene una alta variabilidad de respuesta, por ser heterocigótica, la cual es típica en las poblaciones humanas; por lo que es posible reproducir fielmente los procesos fisiológicos en semejanza con los humanos con mayor grado de exactitud que las otras líneas de ratas evaluadas. Esto demuestra que genéticamente la línea de ratas SD es más estable que las otras evaluadas, además la existencia de una respuesta aceptable a la acción de la sustancia mutagénica que se utilizó.

Conclusiones parciales

1. La línea de ratas Sprague Dawley en ambos sexos difirió significativamente con las otras líneas evaluadas, donde se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos aceptables con ciclofosfamida, teniendo en cuenta las variables analizadas en cada ensayo de genotoxicidad.
2. La línea de ratas Wistar fue la más sensible al mutágeno que se utilizó y se encontraron los valores de daño endógeno más altos.

4.1.3. Comparación de los niveles de daño al ADN espontáneo e inducido entre la línea de ratón y de rata más sensible

Según los resultados que se obtuvieron en los objetivos anteriores, los ratones de la línea BALB/c resultaron ser los biomodelos más sensibles al compararse con las líneas NMRI, OF-1 y C57BL/6. De igual forma, en el caso de las ratas, fueron las SD al ser comparados los índices espontáneos e inducidos de daño al ADN.

Dadas estas consideraciones generales, en este estudio se comparó la respuesta del daño al ADN

espontáneo e inducido con CF a los tres niveles de expresión del daño (estructura primaria del ADN, cromosomas y célula) entre ratones de ambos sexos de la línea BALB/c y ratas de la línea SD de ambos sexos, en busca del modelo murino más sensible para utilizarse en este tipo de ensayos toxicológicos. Los resultados de la comparación entre ratones BALB/c y ratas SD de ambos sexos en el ensayo cometa alcalino se muestran en la Tabla 13 y en las Figuras 7-10.

Durante los 14 días de administración no se evidenció ningún signo clínico de toxicidad. Esto fue válido para los tres grupos controles y para los animales que se trataron con CF, 48 y 24 h antes de la eutanasia en las dos especies evaluadas. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y las sustancias vehículo 1 y 2 en las dos especies evaluadas al comparar las unidades arbitrarias y el porcentaje de nucleoides en cada uno de los niveles que se analizaron (Tabla 13), ni tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos.

Al comparar los resultados del grupo administrado con CF, con el control negativo y con las sustancias disolventes 1 y 2 se observaron diferencias significativas en cada una de las variables analizadas. El número de unidades arbitrarias inducidas por la CF constituye el doble de las que indujeron las otras sustancias que se utilizaron en los ratones BALB/c (Figura 8); mientras que en las ratas SD las UA inducidas por CF constituyen el triple (Figura 10); por otra parte, se observa también que el efecto fundamental de este mutágeno fue el aumento del porcentaje de nucleoides de nivel 3 y 4 (Figuras 7 y 9), niveles que experimentan mayor daño y degradación del ADN (González y col., 2002; Gutiérrez y col., 2012). La reparación por escisión de nucleótidos es un proceso complejo que elimina al menos un segmento de 29 oligonucleótidos y que puede producir la migración del ADN, lo cual es corregido, según el cálculo de las UA de forma experimental (Doak y col., 2007; Smith y col., 2008). Tomando en consideración las UA como índice de citotoxicidad y genotoxicidad, se observa que bajo las condiciones experimentales empleadas, la línea de ratones BALB/c presentó un intervalo mayor de UA espontáneas respecto a la línea de ratas SD, en ambos sexos, resultados que difieren significativamente ($p < 0,05$).

Estos valores se encuentran en el intervalo de 49,51-57,23 para el caso de ratones BALB/c y entre 32,56-35,03 en ratas SD. Este resultado muestra la conveniencia de la utilización de ratas SD (de ambos sexos), dado que experimentan de forma endógena un mayor porcentaje de nucleoides de nivel 0 o sin daño.

Tabla 13. Comparación entre ratones BALB/c y ratas Sprague Dawley de ambos sexos en el ensayo cometa, según inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos	Sexo	LM-ADN (μm)	Unidades Arbitrarias	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
				(% Nucleoides)				
Ratones BALB/c de ambos sexos								
Control Negativo	H	60,36 \pm 2,20	49,51 \pm 10,24	56,00 \pm 8,01	39,29 \pm 7,49	4,01 \pm 4,17	0,60 \pm 0,68	0,10 \pm 0,05
	M	62,42 \pm 4,11	56,37 \pm 7,51	51,03 \pm 3,14	42,72 \pm 5,68	5,10 \pm 2,77	1,15 \pm 1,05	0,00 \pm 0,00
Sustancia Vehículo 1	H	61,87 \pm 3,85	57,23 \pm 10,20	50,82 \pm 9,32	42,13 \pm 2,22	6,05 \pm 5,28	1,00 \pm 0,93	0,00 \pm 0,00
	M	60,77 \pm 4,51	54,25 \pm 8,90	55,50 \pm 9,01	36,15 \pm 3,58	7,00 \pm 4,66	1,30 \pm 1,45	0,05 \pm 0,03
Sustancia Vehículo 2	H	63,75 \pm 3,04	52,15 \pm 10,31	57,47 \pm 3,76	34,27 \pm 8,58	6,90 \pm 4,50	1,36 \pm 0,46	0,00 \pm 0,00
	M	61,21 \pm 2,47	56,33 \pm 7,62	49,97 \pm 10,03	44,92 \pm 2,02	4,00 \pm 5,76	1,03 \pm 0,49	0,08 \pm 0,02
Control Positivo (CF) ¹	H	80,99 \pm 8,80*	118,02 \pm 13,28*	23,33 \pm 5,22*	53,02 \pm 10,64*	10,41 \pm 4,99*	8,78 \pm 3,90*	4,46 \pm 1,43*
	M	81,56 \pm 9,56*	112,69 \pm 14,11*	25,80 \pm 3,41*	52,78 \pm 11,98*	9,37 \pm 1,90*	7,03 \pm 2,01*	5,02 \pm 0,91*
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos								
Control Negativo	H	48,41 \pm 2,91a	34,80 \pm 10,24a	79,14 \pm 4,32a	11,86 \pm 5,02a	5,37 \pm 3,10	2,32 \pm 1,01a	1,31 \pm 1,00a
	M	47,63 \pm 3,10a	33,46 \pm 7,51a	80,10 \pm 5,22a	11,23 \pm 5,56a	5,00 \pm 2,89	2,45 \pm 1,20	1,22 \pm 0,98a
Sustancia Vehículo 1	H	49,32 \pm 3,02a	32,56 \pm 10,20a	80,32 \pm 7,83a	11,11 \pm 4,28a	5,25 \pm 2,99	2,33 \pm 1,73a	0,99 \pm 0,34a
	M	46,56 \pm 2,84a	35,03 \pm 8,90a	78,21 \pm 9,10a	13,19 \pm 4,77a	4,98 \pm 2,33	2,60 \pm 1,26	1,02 \pm 0,83a
Sustancia Vehículo 2	H	48,68 \pm 1,99a	33,19 \pm 10,31a	80,46 \pm 6,59a	10,78 \pm 5,11a	5,17 \pm 3,15	2,29 \pm 1,51	1,30 \pm 0,99a
	M	47,70 \pm 3,54a	33,44 \pm 7,62a	79,75 \pm 3,83a	12,19 \pm 4,99a	4,96 \pm 2,51	2,07 \pm 1,65	1,28 \pm 1,01a
Control Positivo (CF) ¹	H	72,13 \pm 6,92*	101,45 \pm 13,28*a	35,56 \pm 3,55*a	43,47 \pm 3,44*a	10,31 \pm 3,91*	6,08 \pm 2,80*a	4,78 \pm 2,46*
	M	71,81 \pm 5,66*a	106,83 \pm 14,11*	32,76 \pm 4,88*	44,67 \pm 4,77*a	10,56 \pm 3,68*	7,00 \pm 2,00*	5,01 \pm 2,51*

CF (Ciclofosfamida), ¹Administración por vía i.p. *p<0,05 (comparación contra el control negativo en la misma especie, test de U de Mann Whitney). a=p<0,05 (difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, test de U de Mann Whitney). (X media; D.E desviación estándar, para las dos series analizadas). LM: Longitud de migración del ADN. H: Hembras. M: Machos.

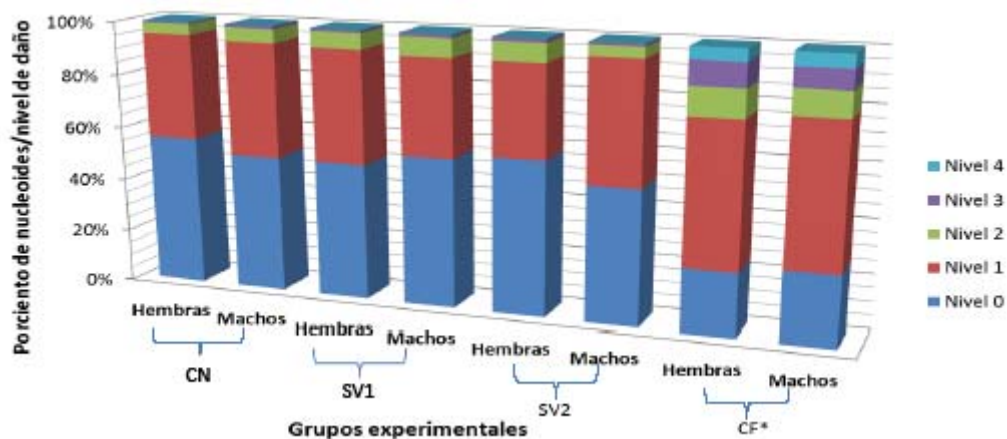


Figura 7. Porcentaje de nucleoides por nivel de daño en cada grupo experimental (ambos sexos) en ratones BALB/c. CN=Control negativo. SV1=Sustancia vehículo 1. SV2= Sustancia vehículo 2. CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal.

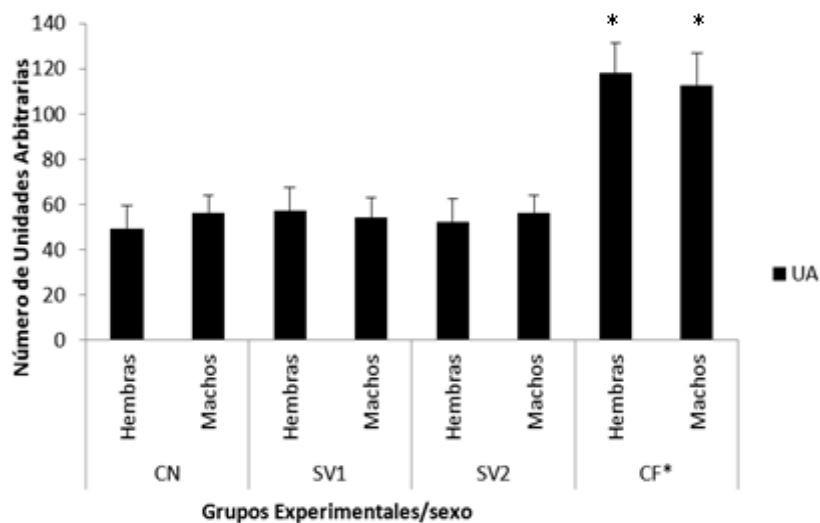


Figura 8. Unidades Arbitrarias (UA) para cada grupo experimental (ambos sexos) en ratones BALB/c. CN=Control negativo. SV1=Sustancia vehículo 1. SV2= Sustancia vehículo 2. CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal. * $p < 0,05$ (comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).

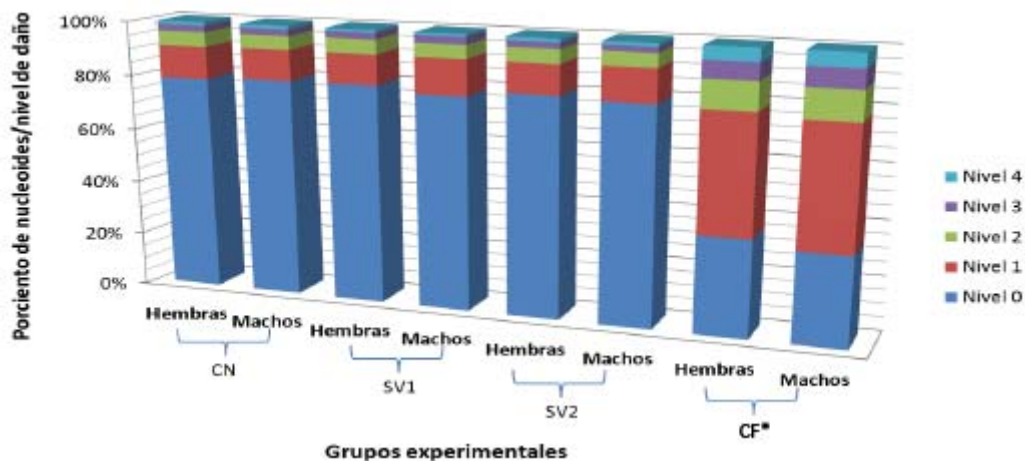


Figura 9. Porcentaje de nucleoides por nivel de daño en cada grupo experimental (ambos sexos) en ratas Sprague Dawley. CN=Control negativo. SV1=Sustancia vehículo 1. SV2= Sustancia vehículo 2. CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal.

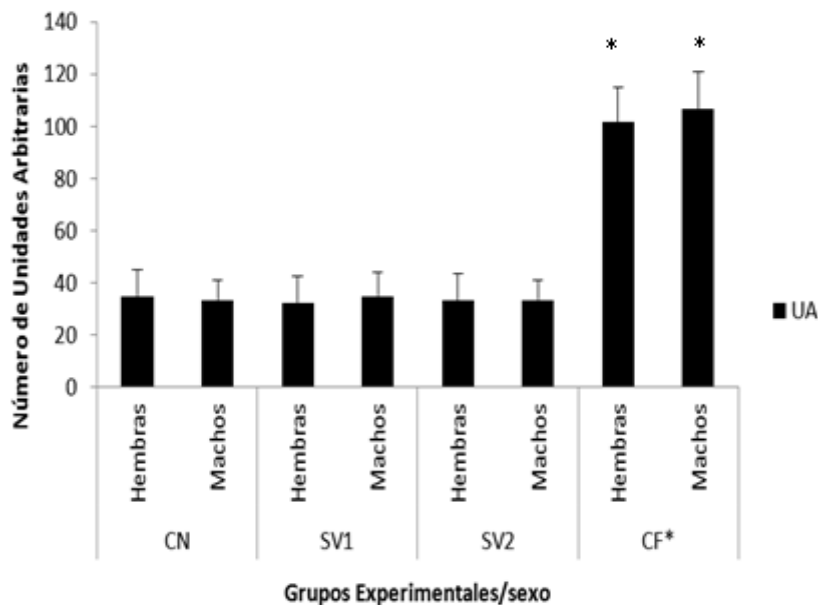


Figura 10. Unidades Arbitrarias (UA) para cada grupo experimental (ambos sexos) en ratas Sprague Dawley. CN=Control negativo. SV1=Sustancia vehículo 1. SV2= Sustancia vehículo 2. CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal. * $p < 0,05$ (Comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).

Respecto a los niveles de daño 1 y 2, las ratas SD presentaron los valores más bajos (4,96-13,19 %) y los ratones BALB/c los valores más altos (4,00-44,92 %), difiriendo de forma significativa a los que se obtuvieron, tanto de forma endógena como inducida con CF. Los nucleoides grado 1 y 2 inducidos por CF en ratas SD registraron valores entre 10,31-44,67 % y entre 9,37-53,02 % para el caso de los ratones BALB/c.

La comparación mostró que la línea de ratas SD fue más sensible en el ensayo cometa que los ratones BALB/c, ya que las ratas SD experimentaron índices menores endógenos y mayor resistencia al daño inducido por la CF bajo las condiciones experimentales empleadas, lo cual concuerda con Moreno y col., (2010) y Vidal y col., (2010), donde se evaluaron ratas SD como modelo experimental en ensayos de genotoxicidad y de antigenotoxicidad.

Los resultados obtenidos son importantes para este tipo de estudio, ya que las ratas SD constituyen una línea heterocigótica, por lo cual mimetizará con mayor grado los posibles efectos de un fármaco evaluado mediante este ensayo en el humano, lo que no se observó en los ratones de la línea BALB/c, la cual es isogénica. Los niveles 3 y 4 también difirieron entre especies al considerar los valores endógenos y al comparar los valores inducidos, los resultados mostraron un comportamiento similar.

El alto porcentaje de inducción de nucleoides de los niveles 1-4 en ratones BALB/c y ratas SD con CF como control positivo evidencia la utilidad de este clastógeno químico como inductor de daño genotóxico mediante esta técnica en las especies utilizadas. La CF es más barata, fácil de manipular, presenta menor riesgo para el personal, así como rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles contaminados al compararse con la BL (Tripathi y Jena, 2010).

En la Tabla 14 se observan los resultados del ensayo de micronúcleos al comparar los índices espontáneos e inducidos en ambas especies evaluadas. Se corroboró que el índice de citotoxicidad endógeno en ratones BALB/c se encuentra en el rango entre 1,15-1,19, y el inducido está en el orden entre 0,85-0,87.

Para el caso del índice de genotoxicidad se observa que el valor espontáneo del porcentaje de EP con MN en esta línea de ratones se encuentra entre 0,13-0,18%, para un total de MN observados entre 19-26. Para el caso de la inducción de genotoxicidad con CF, este índice experimentó un ascenso que difiere de forma significativa con los grupos controles, estando en un rango de valores desde 1,65-1,82%, al inducir la formación de un número total de MN entre 233-258.

Tabla 14. Comparación de la frecuencia basal e inducida de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea entre ratas SD y ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupos	n	EP/EN ^d	MN-EP (%) ^d	MN ^D
Ratones BALB/c				
Machos				
Control negativo	10	1,18 ± 0,01	0,16 ± 0,03 ^a	23 ^a
Sustancia vehículo 1	10	1,16 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,04	26
Sustancia vehículo 2	10	1,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04	25
Control positivo (CF) ^a	10	0,87 ± 0,03*	1,82 ± 0,89* ^a	258*
Hembras				
Control negativo	10	1,15 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,04 ^a	19 ^a
Sustancia vehículo 1	10	1,17 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,07 ^a	20 ^a
Sustancia vehículo 2	10	1,19 ± 0,04	0,17 ± 0,08	24
Control positivo (CF) ^a	10	0,85 ± 0,02* ^a	1,65 ± 0,77*	233* ^a
Ratas Sprague Dawley				
Machos				
Control negativo	10	1,20 ± 0,03	0,19 ± 0,05	27
Sustancia vehículo 1	10	1,19 ± 0,04	0,21 ± 0,02	30
Sustancia vehículo 2	10	1,18 ± 0,06	0,15 ± 0,06	22
Control positivo (CF) ^a	10	0,90 ± 0,03*	1,68 ± 0,92*	241*
Hembras				
Control negativo	10	1,19 ± 0,06	0,22 ± 0,01	32
Sustancia vehículo 1	10	1,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	29
Sustancia vehículo 2	10	1,18 ± 0,04	0,17 ± 0,05	25
Control positivo (CF) ^a	10	0,89 ± 0,04*	1,74 ± 1,03*	250*

CF (Ciclofosfamida). ^aAdministración por vía ip. (^ddeterminaciones en 2 000 células/animal, *p<0,05 comparación con el control, ANOVA, X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales). (^Ddeterminaciones en 2 000 EP/animal, *p<0,01 (comparación con el control, prueba no paramétrica de χ^2 , para las dos series experimentales). ^a= p<0,05 (difere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística. EP: Eritrocitos policromáticos. EN: Eritrocitos normocromáticos. MN: Micronúcleos.

Con los resultados que se observan en la Tabla 14, se corroboraron los índices espontáneos presentes en esta especie, teniendo en cuenta, el índice de citotoxicidad que se encuentra entre 1,18-1,21 y el índice de genotoxicidad entre 0,15-0,22. Para el caso de los resultados inducidos con la CF, se corroboró que esta mutágeno es capaz de inducir citotoxicidad en esta especie de ratas con valores entre 0,89-0,90 e inducir a su vez genotoxicidad con valores entre 1,68-1,74 con la formación de 241-250 MN totales.

Se demostró que mediante el mecanismo de formación endógena de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea, los ratones BALB/c son más estables genéticamente que las ratas SD, constituyendo un factor predominante en este estudio el hecho de que esta línea de ratón es isogénica, obteniendo bajas tasas de variaciones genéticas y epigenéticas entre individuos.

En la Tabla 15 se muestran los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas. Para el caso de los ratones BALB/c los resultados espontáneos del número de células con aberraciones se encuentran entre 7-10. Igualmente se encontraron resultados bajos de células con poliploidía con valores entre 0-1. El índice mitótico espontáneo fue alto con valores entre 4,98-5,98%. Además, el número de metafases con aberraciones cromosómicas estructurales de tipo *Gaps* fue entre 2-6.

Al realizar un análisis de estas mismas variables, pero inducidas con la administración de CF vía i.p, se encontró que este mutágeno indujo la formación de 175-192 células con aberraciones, al considerarse un potente inductor de aberraciones de tipo estructural. El número de células con poliploidía observadas estuvo en el orden de entre 14-18 y el índice mitótico experimentó un descenso significativo al compararlo con los controles entre 3,89-3,93%. Por su parte, la inducción de metafases con aberraciones de tipo *Gaps* difirió con los valores espontáneos, con resultados entre 44-47 (Tice y col., 1994; Recio y col., 2010; Gutiérrez y col., 2012).

En ratas SD se obtuvieron 17-23 células totales con aberraciones y de 4-8 metafases con aberraciones de tipo *Gaps*, ambos valores de frecuencia espontánea. Los valores espontáneos de células con poliploidías se encuentran entre 1-3 y el índice mitótico entre 4,81-5,29. Estos valores espontáneos difirieron con los que se obtienen por la CF, lo que permite la validez, repetitividad y eficiencia de esta prueba. La CF indujo entre 220-246 células totales con aberraciones en esta línea de ratas. Además, el rango de células con aberraciones *Gaps* fue entre 62-69, el número de células con poliploidía estuvo entre 23-28 células y el índice mitótico experimentó un marcado descenso al compararlo con los controles entre 3,40-3,58%.

Tabla 15. Comparación de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea entre ratas SD y ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	# de Células con aberraciones ^b
Ratones BALB/c				
Machos				
Control Negativo	5,65 ± 0,56	1	4	7 ^a
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,89 ± 0,24* ^a	14** ^a	47** ^a	175** ^a
Sustancia Vehículo 1	5,49 ± 0,53	0	6	8
Sustancia Vehículo 2	5,86 ± 0,20 ^a	0	7	10 ^a
Hembras				
Control Negativo	5,98 ± 0,22 ^a	1	6	8
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,93 ± 0,84* ^a	18** ^a	44** ^a	192** ^a
Sustancia Vehículo 1	4,98 ± 0,79	0	5	8
Sustancia Vehículo 2	5,12 ± 0,63	1	2	9 ^a
Ratas Sprague Dawley				
Machos				
Control Negativo	4,93 ± 0,09	2	6	17
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,58 ± 0,43*	23**	62**	220**
Sustancia Vehículo 1	5,12 ± 0,18	2	7	18
Sustancia Vehículo 2	5,29 ± 0,25	3	4	23
Hembras				
Control Negativo	4,81 ± 0,10	1	5	18
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,40 ± 0,26*	28**	69**	246**
Sustancia Vehículo 1	4,97 ± 0,21	3	8	19
Sustancia Vehículo 2	5,19 ± 0,32	1	6	20

^aX ± D.E, de un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas, *p<0,05; ANOVA. ^b**p<0,01; prueba no paramétrica χ^2 . Comparación contra el control negativo para ambas pruebas en cada especie. ^ap<0,05 (difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística. IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.

En el ensayo AC el biomodelo más eficiente en cuanto a los índices espontáneos son los ratones BALB/c, al experimentar un menor número de células con aberraciones, pero las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, la cual indujo mayor número de aberraciones.

En la Tabla 16 se observan los resultados del número de espermatozoides anómalos espontáneos en ratones de la línea BALB/c, los cuales se encuentran en valores de 10,7-16,8. En esta línea de ratón el mayor número de espermatozoides anómalos fueron amorfos, estando en el rango espontáneo entre 6,2-12,0. La concentración espermática de esta línea de ratón se encuentra entre $2,24-2,27 \times 10^6$ células/mL. Tanto los resultados de citotoxicidad como de genotoxicidad espontáneos encontrados difieren significativamente con los obtenidos con el uso de la CF; lo cual valida los resultados obtenidos en este estudio.

La CF en ratones BALB/c indujo valores entre 94,2-106,8 espermatozoides anómalos en conteo de 500 células totales; siendo los espermatozoides en forma anómala amorfa los de mayor frecuencia (Fernández y col., 2006; Curbelo y col., 2011). También este mutágeno fue capaz de ejercer su efecto citotóxico, al disminuir de forma considerable la concentración espermática en epidídimos, estando en valores entre $0,34-1,34 \times 10^6$ células/mL.

En ratas SD se encontraron valores de espermatozoides anómalos espontáneos en el rango entre 39,4-44,7 células en conteo total de 500 (Tabla 16). Las formas predominantes de anomalías espermáticas en la cabeza del espermatozoides que se observaron fueron amorfo, banana y sin gancho y se corroboró que la concentración espermática de esta línea de rata se encuentra en el rango $1,97-2,18 \times 10^6$ células/mL.

La CF indujo en ratas SD entre 85,0-99,09 espermatozoides anómalos en 500 células totales, con un aumento del número de espermatozoides amorfos, banana y sin gancho, resultados que difieren de forma significativa con los endógenos de esta especie. A su vez, al inducir la CF estas formas anómalas justifica su uso como control positivo en protocolos de estudios de teratogénesis y fertilidad (Rezvanfar y col., 2008).

Al comparar los resultados espontáneos e inducidos entre ambas especies en los cuatro ensayos evaluados, se obtuvo que la línea de ratones BALB/c difiere con las ratas SD en todas las variables analizadas; siendo esta línea de ratones la de valores espontáneos más bajos en cuanto al análisis de las variables genotóxicas, pero a su vez, esta línea experimentó mayor concentración espermática que las ratas SD. Al analizar los resultados de las variables inducidas

Tabla 16. Comparación entre ratones BALB/c y ratas SD en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide y concentración espermática en epidídimos.

Grupos	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	Concentración* (10 ⁶) Células/mL	% EGC
Ratones BALB/c								
CN	489,32±5,83a	10,72±5,83a	6,20±5,7a	1,20±1,77a	2,01±3,8a	0,30±1,5a	2,27 ± 0,22a	4,11±1,16
SV1	483,27±8,30a	16,83±5,90a	12,00±1,61	1,74±0,30a	2,60±3,11a	0,51±0,95a	2,24 ± 0,26	3,90±1,95a
SV2	487,62±3,75a	12,47±3,75a	7,16±5,20a	1,71±1,20a	3,12±2,73a	0,52±0,26a	2,25 ± 0,35a	3,84±1,39a
CF ^a	399,5±12,33*	100,51±6,33*	39,10±6,84*a	22,10±3,76*	29,90±6,18*	9,44±2,06*a	0,84 ± 0,55*	26,57±7,11*a
Ratas Sprague Dawley								
CN	460,42 ± 19,43	39,60 ± 10,40	14,31 ± 4,36	10,40 ± 8,22	13,70 ± 6,86	1,20 ± 0,77	2,18 ± 0,53	7,51 ± 2,37
SV1	460,60 ± 8,35	39,40 ± 8,38	16,61 ± 6,64	9,32 ± 4,43	11,81 ± 3,71	1,71 ± 0,90	2,09 ± 0,37	6,42 ± 3,24
SV2	455,30 ± 17,58	44,71 ± 13,53	18,40 ± 3,84	11,42 ± 7,96	12,61 ± 6,10	2,30 ± 1,73	1,97 ± 0,27	8,92 ± 4,10
CF ^a	408,02 ± 7,08*	92,01 ± 7,07*	27,62 ± 8,01*	30,01 ± 2,97*	30,50 ± 7,04*	3,93 ± 0,56*	0,81 ± 0,32*	43,23 ± 6,12*

CN: Control negativo. SV1: Sustancia vehículo 1. SV2: Sustancia vehículo 2. CF: Ciclofosfamida. ^a Administración por vía i.p, durante 5 días. Determinaciones en 500 células/animal. *p<0,05 (comparación con el control negativo en la misma especie, ANOVA). a=p<0,05 (difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series experimentales). EGC=Espermatozoides con gota citoplasmática.

se observa que igualmente en el caso de la morfología de la cabeza del espermatozoide los ratones BALB/c son más susceptibles a la CF, pero al medir la citotoxicidad mediante la concentración espermática resultaron ser más resistentes al daño inducido por la CF que las ratas SD. Las diferencias de respuesta entre biomodelos es marcada si se tiene en cuenta que Curbelo y col., (2011), observaron diferencias significativas dentro de una misma línea de ratones a la acción de mutágenos químicos clásicos como la CF con solo variar la dosis.

Los factores que determinan la respuesta o exposición a los tóxicos, tanto ambientales como a los xenobióticos, se clasifican entre los que dependen del medio ambiente, propios del individuo (endógeno o biológico), y los derivados de la condiciones de administración o absorción del tóxico (Repetto y Repetto, 2009).

En el diseño experimental de todos los estudios discutidos en este epígrafe, tanto para las diferentes líneas de ratones como de ratas, se mantuvieron controladas las condiciones ambientales externas, así como las vías, dosis aplicadas, vehículos utilizados, fueron comunes para todos los diseños experimentales. Por tanto, puede que las causas fundamentales de una respuesta diferente entre líneas de ratones y de ratas están vinculadas a los factores propios del individuo (endógeno o biológico). Estos factores afectan uno o varios pasos o mecanismos de los procesos toxicocinéticos incluidos los de biotransformación, de fase 1 y 2.

En estudios previos se estableció que las diferencias entre líneas genéticas de roedores, están dadas por los factores genéticos y epigenéticos. Tal y como se refirió con anterioridad, Liu y col., (2009), compararon la susceptibilidad de tres líneas de ratones machos endogámicos (C57BL/6, DBA/2, BALB/c), a la exposición 1-Bromopropano, obteniendo diferencias significativas entre líneas. De igual forma obtuvieron diferencias entre ratones BALB/c y ratas Fisher 344.

Garner y col., (2006), obtuvieron mayor susceptibilidad en los ratones en relación con las ratas, por mayor capacidad para el metabolismo de 1-Bromopropano a través de la oxidación en el ratón B6C3F1 que en ratas Fischer 344, tal y como lo había demostrado Nakajima y col., (1993), en un estudio de la administración intravenosa del 1-Bromopropano, la diferencia en la susceptibilidad era debido a los mayores niveles de CYP2E1 en el hígado de ratones B6C3F1 machos en comparación con los niveles en ratas machos Wistar (Nakajima y col., 1993).

Liu y col., (2009), recomiendan que para delucidar las diferencias entre líneas de ratones se debe realizar una investigación adicional exploratoria sobre factores de susceptibilidad mediante el

análisis genético de segmentos de ADN relacionados con los genes que subyacen a un carácter cuantitativo mediante el análisis de rasgos cuantitativos de locus en inglés *Quantitative Trait Locus Analysis* (QTL) (Bloom y col., 2013). Permiten obtener regiones del genoma que contienen genes implicados en la especificación de un rasgo cuantitativo, se realiza usando marcadores moleculares.

Este es un primer paso en la identificación y secuenciación de los genes reales subyacentes para la variación de un rasgo. Los rasgos cuantitativos se refieren a fenotipos (características), varían en el grado y se pueden atribuir a efectos poligénicos, es decir, producto de dos o más genes, y su entorno (Bloom y col., 2013).

Ripoll y col., (2003), plantean que las diferencias en la respuesta al uso de antidepresivos para dar sedación en varias líneas de ratones en el ensayo de suspensión por la cola se debe a la variación de densidad del receptor, la afinidad para los receptores, desensibilización, transducción, o diferencias en el acople con la proteína G en el cerebro. Por otro lado, Borges y col., (2007), en un estudio sobre tolerancia a endotoxinas establecieron que las diferencias entre las líneas de ratones C57BL/6 y BALB/c se deben a que esta última es más sensible a la bleomicina, resultados que obtuvo cuando monitoreó los niveles de lactato deshidrogenasa y su relación con la actividad de la polimerasa nuclear.

Xiaoqing y Howard, 2001, demostraron que las diferencias en la respuesta mínima a imipramina estaba dada por las diferencias genéticas entre 11 híbridos de ratones, por las causas antes expuestas: diferencias en la densidad del receptor, afinidad del receptor y las vías de transducción postreceptor.

Además, las diferencias encontradas en cuanto a la respuesta de CF se deben a diferentes niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima citocromo P-4501A1 en el hígado, ya que en estudios previos se demostró que existen diferencias moleculares y conformacionales en esta enzima entre diferentes especies y entre líneas diferentes en ratas y ratones. Esta enzima hepática es fundamental en la fase I del metabolismo de xenobióticos, que participa en el metabolismo de la CF en el hígado al utilizarse como fármaco citotástico (Amri y col., 1986; Jana y col., 1998; Quinones y col., 2008).

De esta forma se demuestra que las diferencias epigenéticas ya encontradas entre estas especies de ratón y de ratas (Amri y col., 1986), tienen una alta repercusión en la respuesta endógena e

inducida de daño al ADN, al tener índices de daño endógeno tan alto, no permite clasificar en un menor margen de error aquellas sustancias que se clasifican como de baja acción genotóxica.

Las diferencias epigenéticas siguen siendo el factor predominante a la respuesta endógena e inducida en estudios farmacológicos y toxicológicos, pues las líneas de roedores, difieren en las tasas de susceptibilidad puesto que la ADN polimerasa durante la fase de replicación presenta un polimorfismo genético alto entre especies-líneas, que trae como consecuencia diferencias en la tasa de corrección de la reparación por mutación que depende de la especie, línea-individuo (Caldji y col., 2004).

Ohta y col., (2009), encontraron diferencias significativas en los índices espontáneos de anomalías en el espermatozoide incluyendo las de la cabeza en ratones BALB/c con edades y sublíneas diferentes, compararon las anomalías obtenidas entre la primera generación y sus hijos y concluyeron que estas anomalías dependían de la edad y las generaciones obtenidas.

El factor propio del individuo (endógeno o biológico), también pudiera ser la causa de las diferencias encontradas con otros autores, debido al alto grado de variación epigenética entre las especies de roedores dado por la expresión del genotipo y el fenotipo al ambiente y la alimentación (Amri y col., 1986; Jana y col., 1998; Quinones y col., 2008; Ohta y col., 2009; Sanhueza y Valenzuela, 2012).

El impacto del medio ambiente puede ser externo o interno; el efecto externo se determina por la temperatura, cantidad de luz, humedad ambiental, cantidad de gases contaminantes, presión atmosférica, entre otros y el efecto interno se determina principalmente por la dieta (Sanhueza y Valenzuela, 2012). La dieta tiene efectos diversos sobre los distintos individuos y el estudio de estos efectos conduce al desarrollo de la nutrigenómica (Houle y col., 2010).

Los nutrientes que a diario y durante varias veces al día ingresan al organismo determinan expresiones de la nutrigenómica y de la nutrigenética. La nutrigenómica implica entender cómo los componentes de la dieta afectan la expresión de los genes, es decir, qué genes se inducen y cuales se reprimen frente a un determinado nutriente. La nutrigenética, se ocupa de entender el cómo responden los genes frente a una dieta determinada, teniendo en cuenta la variación en la población y sobre todo la individual.

En este punto debe tenerse en cuenta el rol que cumplen los polimorfismos de un sólo nucleótido y por otro lado los efectos epigenéticos, que sin duda influyen en todos los niveles, es decir, en la

transcriptómica, la proteómica y la metabolómica (Xacur-García y col., 2008; Houle y col., 2010; Sanhueza y Valenzuela, 2012).

Se conoce como influyen los componentes bioactivos de los alimentos y como estos pueden interactuar con los genes, afectando a los factores de transcripción, expresión de proteínas y producción de metabolitos. La dieta logra efectos negativos o positivos, al relacionarse con los genes en los marcadores epigenéticos como patrones de metilación, acetilación de histonas o cambios en modificaciones post-traduccionales de las histonas y cambios en las proteínas asociadas a la cromatina (Rodríguez y col., 2004; Xacur-García y col., 2008; Houle y col., 2010; Fenech y col., 2011; Sanhueza y Valenzuela, 2012).

Otros autores han estudiado desde el punto de vista epigenético el efecto de la edad, la dieta y el estilo de vida en el grado de variación a la respuesta y formación de micronúcleos en sangre periférica humana, obteniendo como resultado que estas variables tienen una relación directamente proporcional, es decir de cualquiera de las dos variantes al analizar los factores independientes o en su conjunto aumentan la frecuencia de micronúcleos en EP de sangre periférica (Fenech y Bonassi, 2010). Por otra parte, la nutrición ejerce su impacto en los resultados de salud, al afectar directamente la expresión de genes en las vías metabólicas esenciales o indirectamente, al afectar la incidencia de mutaciones genéticas en la secuencia de bases y de los cromosomas, que a su vez, provoca alteraciones en la expresión génica (Fenech y col., 2011).

Conclusiones parciales

1. El biomodelo más sensible en el ensayo cometa fueron las ratas Sprague Dawley, estos valores difirieron significativamente con los resultados en ratones BALB/c, teniendo en cuenta los valores espontáneos e inducidos de daño al ADN.
2. Los resultados de la comparación entre ambas especies en el ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y de la morfología de la cabeza del espermatozoide evidenciaron que el biomodelo experimental más sensible en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c.
3. Las ratas Sprague Dawley demostraron ser más susceptibles a la ciclofosfamida, la cual indujo mayor número de micronúcleos y células con aberraciones, siendo esta línea de ratas el biomodelo más sensible para determinar actividad genotóxica de nuevos fármacos

que induzcan daño al ADN por efecto alquilante.

4.2. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en diferentes diseños experimentales en la línea de ratón y de rata seleccionada como biomodelos de antigenotoxicidad

4.2.1. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratas SD de ambos sexos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo cometa alcalino

Según los resultados expuestos en la Tabla 17, los 4 grupos en los cuales se utilizaron las sustancias mutagénicas difirieron de forma significativa con el grupo control disolvente. Esto demuestra, que se logró inducir una respuesta genotóxica en los linfocitos de sangre periférica aceptable. Los valores que se observaron en el grupo tratado con NaCl al 0,9% concuerdan con los declarados en Cuba, tanto para el porcentaje de nucleoides en cada uno de los niveles de daño como para las UA; por lo cual permitió corroborar que los valores espontáneos del porcentaje de nucleoides de grado 0 en esta especie de rata se encuentra entre 78,77-87,47 en las hembras y 68,04-82,46 en los machos (González y col., 2002).

Teniendo en cuenta los dos esquemas de tratamientos en los cuales se utilizó la CF se observa que difirieron de forma significativa en ambos sexos. Se obtuvieron mayores resultados de inducción de daño en el ADN, UA y longitud de migración del ADN con el uso de la CF administrada 48 y 24 h antes de la eutanasia. Dado por un carácter genotóxico acumulativo y de tiempo para ejercer su potencial genotóxico (Gutiérrez y col., 2012), los valores de UA en este grupo estuvieron entre 86,6-115,36 en las hembras y de 98,42-120,84 en los machos; mientras que el porcentaje de nucleoides grado 0 estuvo en las hembras entre 31,15-37,03% y en los machos entre 27,72-34,54%.

Los dos grupos que se administraron con BL también difirieron de forma significativa. Se obtuvo mayor resultado de inducción al administrar la BL en dos ocasiones. Los valores de UA para el grupo en el cual se administró la BL 48 y 24 h antes de la eutanasia, estuvieron entre 90,04-111,37 en las hembras y 85,8-120,46 en los machos. El porcentaje de nucleoides grado 0 fue de 34,20-37,12% en las hembras y 31,81-36,03% en los machos. Esto se debe a una mayor biodisponibilidad correspondiente al mutágeno, pues se encuentran en una relación directamente proporcional las variables número de exposiciones con la cantidad de daño al ADN inducido,

Tabla 17. Ensayo cometa en ratas Sprague Dawley de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupos	Sexo	LM-ADN (μm)	Unidades Arbitrarias ^T	Grado 0 ^T	Grado 1 ^T	Grado 2 ^T	Grado 3 ^T	Grado 4 ^T
				(% Nucleoides)				
CN	H	45,00 \pm 3,14	29,51 \pm 14,10	83,12 \pm 4,35	8,47 \pm 3,18	5,17 \pm 2,90	2,26 \pm 1,43	0,98 \pm 0,44
	M	46,51 \pm 2,10	37,79 \pm 7,80	75,27 \pm 7,21	16,16 \pm 2,68	5,08 \pm 2,03	2,49 \pm 1,24	1,00 \pm 0,23
CF1	H	62,00 \pm 3,19a	55,26 \pm 8,49a	64,09 \pm 3,74a	23,41 \pm 3,11a	7,01 \pm 1,88a	4,13 \pm 1,81a	1,36 \pm 1,09a
	M	64,14 \pm 2,99a	61,59 \pm 3,29a	60,98 \pm 2,91a	25,37 \pm 2,52a	6,95 \pm 2,32a	4,48 \pm 2,57a	2,22 \pm 1,46a
CF2	H	73,23 \pm 5,12abc	100,98 \pm 14,38abc	34,09 \pm 2,94abc	44,61 \pm 2,14abc	11,41 \pm 2,71abc	6,01 \pm 1,72ab	3,88 \pm 1,99abc
	M	74,38 \pm 4,29abc	109,63 \pm 11,21abc	30,13 \pm 4,41abc	46,87 \pm 3,57abc	10,96 \pm 4,52abc	7,32 \pm 1,97abc	4,72 \pm 2,21abc
BL1	H	63,08 \pm 2,07a	56,34 \pm 7,92a	63,11 \pm 2,94a	24,51 \pm 2,14a	6,89 \pm 2,11a	3,91 \pm 1,63a	1,58 \pm 0,39a
	M	62,81 \pm 3,00a	56,91 \pm 2,75a	63,78 \pm 4,41a	23,17 \pm 3,57a	7,13 \pm 1,22a	4,20 \pm 1,51a	1,72 \pm 0,46a
BL2	H	60,74 \pm 4,50a	100,72 \pm 10,68abc	35,66 \pm 1,46abc	43,10 \pm 3,61abc	10,32 \pm 1,99abc	5,90 \pm 1,22ab	4,82 \pm 3,39abc
	M	63,88 \pm 3,10a	103,13 \pm 17,33abc	33,92 \pm 2,11abc	44,56 \pm 5,28abc	10,32 \pm 3,82abc	6,87 \pm 2,47abc	4,33 \pm 2,11abc

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando el test de U de Mann Whitney, con $p < 0,05$ prefijada. (**X** media; **DE** desviación estándar, para las dos réplicas experimentales). **a**= difiere con el control negativo. **b**=difiere entre los diferentes tratamientos para el mismo mutágeno. **c**=difiere entre mutágenos sin tener en cuenta el tratamiento. **CF1**= ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia. **CF2**= ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. **BL1**= bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia. **BL2**= bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. **CN**= Control negativo. **LM**: Longitud de migración del ADN. H: Hembras. M: Machos.

justificada por ser la BL un mutágeno de acción directa (Bolzán y col., 2008; 2011).

No se observaron diferencias significativas entre la CF y BL en los grupos en los cuales se administraron los animales en dosis única; como tampoco difirieron los resultados entre CF y BL al administrarlas en dos ocasiones 48 y 24 h antes de la eutanasia en ambos sexos.

Se utiliza como control positivo con mayor eficiencia en este ensayo la BL, midiendo el daño tanto en modelos de genotoxicidad como de estrés oxidativo. La BL induce labilidad de la estructura del ADN y ruptura del ADN al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres (Mani y col., 1995). La BL se une al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo que activa genera radicales libres que se encargan de la ruptura, lo cual trae consigo, la aparición de aberraciones, sobre todo, rupturas de cromátidas, huecos, fragmentos y translocaciones, éstas últimas en menor medida (Prieto y col., 1999; Cancino y col., 2001).

Los resultados con el uso de la CF, permitieron reafirmar que es posible utilizar este mutágeno en la inducción de daño en la estructura primaria del ADN. Además, el uso de la CF permite utilizar un mutágeno más barato, fácil de manipular, con menor riesgo para el personal, así como un rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles que se encuentran expuestos a esta sustancia química durante el experimento (Carmignani Raymund, 1997).

Conclusión parcial

Se obtuvo mayor inducción de daño con el uso de ambos mutágenos en el diseño de dos administraciones a las 48 y 24 h antes de la eutanasia.

4.2.2. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelos de antígenotoxicidad en el ensayo de micronúcleos de eritrocitos de médula ósea

En la Tabla 18 se observa que tanto los grupos que se administraron con CF, como los que se administraron con BL difieren significativamente con el grupo control negativo en ambos sexos ($p < 0,05$), en cuanto al índice de citotoxicidad dado por la relación (EP/EN), y el porcentaje de eritrocitos policromatófilos que contienen micronúcleos (índice de genotoxicidad).

Se corroboró que la relación (EP/EN) en esta línea de ratón se encuentra en el rango de 1,14-1,20 en los machos y de 1,05-1,21 en las hembras y que el índice de citotoxicidad se encuentra en los machos entre 0,14-0,18% y en las hembras está entre 0,13-0,17%.

Además, ambas sustancias mutagénicas difirieron con el grupo control negativo en ambos sexos,

teniendo en cuenta el número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos. El número total de micronúcleos espontáneos en esta especie en los machos fue de 26 y de 22 en las hembras.

Solo la administración de la CF en dos ocasiones con intervalos de 24 h difirió de forma significativa con los otros grupos, tanto en el índice de citotoxicidad como de genotoxicidad ($p < 0,05$). Se obtienen resultados de 0,85-0,91 de relación (EP/EN) en los ratones machos y de 0,86-0,88 en las hembras, mientras que los resultados del índice de genotoxicidad se encuentran entre 1,52-2,16 en los machos y 0,75-2,43 en las hembras.

En la Tabla 19 se aprecia que la CF, administrada 48 y 24 h antes de la eutanasia, difirió con el otro esquema en que se administró y con los dos esquemas en que se evaluó la BL, teniendo en cuenta el número total de micronúcleos ($p < 0,01$); los cuales son para el caso de los machos de 265 y en las hembras de 228.

La CF que se administró en una sola ocasión no difirió en ambos sexos con los dos esquemas propuestos para la BL, ni tampoco hubo diferencias significativas entre estos dos últimos, al tenerse en cuenta la relación (EP/EN), porcentaje de eritrocitos policromáticos con micronúcleos ($p < 0,05$) y el número total de micronúcleos ($p < 0,01$). Tampoco se observó diferencias significativas entre sexos, en los índices espontáneos e inducidos, en los diferentes tratamientos en que se utilizaron estos dos mutágenos.

Los resultados del daño al ADN espontáneos concuerdan con los rangos que se establecen hasta el momento, al utilizar esta línea de ratones como biomodelo en este ensayo. Además concuerdan al utilizar la CF como agente clastogénico eficiente, al administrarse en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre administraciones (Lóriga y col., 2001; Gutiérrez y col., 2012).

Se encontró que la administración de la CF en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre administraciones difiere de forma significativa con los demás grupos, tanto en el índice de citotoxicidad como de genotoxicidad, por ser este clastógeno químico un promutágeno. Así, al administrarse en dos ocasiones, potencia su acción al aumentar el tiempo de exposición de las células de médula ósea a los metabolitos secundarios, siendo estos los de mayor efecto genotóxico (Mani y col., 1995; Prieto y col., 1999). Además, estos resultados están en conjunción con los encontrados por otros autores en estudios donde se utilizó la CF como mutágeno en ambos diseños, pero en la línea de ratón OF-1 (Fernández y col., 2005).

Tabla 18. Índice de citotoxicidad (EP/EN) y genotoxicidad (MN-EP %) en indicadores del ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos tratados con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupos	EP ^T	EN ^T	EP/EN ^T	MN-EP (%) ^T
Machos				
CN	1077 ± 11,10	923 ± 8,37	1,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02
CF1	938 ± 6,17 aAc	1062 ± 6,10 aAc	0,88 ± 0,03 aAc	1,84 ± 0,30 aAc
CF2	962 ± 6,56 bc	1038 ± 4,11 bc	0,93 ± 0,02 bc	1,30 ± 0,24 bc
BL1	970 ± 7,49 bc	1030 ± 6,32 bc	0,94 ± 0,02 bc	1,20 ± 0,36 bc
BL2	978 ± 3,99 bc	1022 ± 8,48 bc	0,96 ± 0,01 bc	1,25 ± 0,20 bc
Hembras				
CN	1063 ± 9,84	937 ± 8,81	1,13 ± 0,08	0,15 ± 0,02
CF1	929 ± 22,61 aAc	1071 ± 12,47 aAc	0,87 ± 0,01aAc	1,59 ± 0,84 aAc
CF2	969 ± 7,22 bc	1031 ± 7,31 bc	0,94 ± 0,02 bc	1,02 ± 0,13 bc
BL1	974 ± 4,22 bc	1026 ± 4,67 bc	0,95 ± 0,01bc	1,07 ± 0,09 bc
BL2	984 ± 2,24 bc	1016 ± 2,24 bc	0,97 ± 0,01bc	1,12 ± 0,04 bc

^TEl 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 h antes de la eutanasia. CF2=ciclofosfamida administrada 24 h antes de la eutanasia. BL1=bleomicina administrada 48 y 24 h antes de la eutanasia. BL2=bleomicina administrada 24 h antes de la eutanasia. (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo. (A) 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). EP: Eritrocitos policromáticos, EN: Eritrocitos normocromáticos, MN: Micronúcleos.

Tabla 19. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos de ratones BALB/c de ambos sexos tratados con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupos	MN ^T	EP (1 MN) ^T	EP (2 MN) ^T	EP (+2 MN) ^T
Machos				
CN	26	18	7	1
CF1	265aAc	163aAc	87aAc	15aAc
CF2	187bc	126bc	57bc	4bc
BL1	172bc	101bc	64bc	7bc
BL2	180bc	111bc	60bc	9bc
Hembras				
CN	22	14	7	1
CF1	228 aAc	143 aAc	68 aAc	17 aAc
CF2	146 bc	100 bc	39 bc	7 bc
BL1	154bc	110 bc	34 bc	10 bc
BL 2	158 bc	107 bc	42 c	9 bc

^TEl análisis estadístico se realizó utilizando la prueba no paramétrica de Chi Cuadrado, con p<0,01 prefijada. CF1=ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. CF2=ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia. BL1=bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. BL2=bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia. (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo. (A) 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). EP: Eritrocitos policromáticos, MN: Micronúcleos.

La CF que se administró en una sola ocasión no difirió en ambos sexos con los dos esquemas propuestos para la BL, ni tampoco hubo diferencias significativas entre estos dos últimos, al tenerse en cuenta la relación (EP/EN), el porcentaje de EP con micronúcleos y el número total de micronúcleos. Los resultados inducidos que se obtuvieron al administrar la CF en una sola ocasión 24 h antes de la eutanasia, concuerdan con los valores declarados por Yiqiang y col., (2005), en estudios donde se utilizó la línea BALB/c y otras.

Por otro lado, la diferencia significativa que se encontró al comparar la CF administrada en dos ocasiones con los dos tratamientos en los que se utilizó la BL, están dados por el mecanismo que operan cada uno de estos mutágenos, así como por el nivel de especificidad y fidelidad de esta prueba para detectar el tipo de daño que inducen los clastógenos químicos, como es el caso de la CF (OECD, 2009).

La CF logra formar monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas con la consecuente aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos, aumenta la aparición de retardos anafásicos en células somáticas, por lo que se destaca como un clastógeno químico de gran potencia (Prieto y col., 1999; OECD, 2009). Este efecto mutagénico, es capaz este ensayo de detectarlo con mayor grado de especificidad que el que induce la BL, el cual se encuentra mayormente vinculado a la inducción de labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres (Bolzán y col., 2008; 2011).

Al comparar los resultados entre sexos no se observó diferencias significativas, teniendo en cuenta, el índice de citotoxicidad (EP/EN) y de genotoxicidad (% MN-EP). Estas variables se comportaron de forma similar en ambos sexos, tanto de forma espontánea como inducida por CF o BL en los diferentes tratamientos en que se utilizaron estos mutágenos.

Los resultados de este estudio permiten utilizar la CF en dos administraciones como el mejor diseño para inducir retardos anafásicos en células somáticas de la médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos, útil en diseños experimentales de evaluación de fármacos con efectos antígenotóxicos (Fraga y col., 2001; Matuo y col., 2007; Díaz y col., 2008).

Conclusión parcial

Se observó mayor inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y un mayor índice de citotoxicidad con el uso de la ciclofosfamida, administrada a ratones BALB/c en dos ocasiones antes de la eutanasia, con intervalos de 24 h entre ambas administraciones.

4.2.3. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo de aberraciones cromosómicas de eritrocitos de médula ósea

En la Tabla 20 se observan los resultados pertenecientes a las aberraciones cromosómicas de tipo numérico tales como el índice mitótico y el número de células con poliploidía. Tanto en las hembras como en los machos, la CF que se administró a las 48 y 24 h antes de la eutanasia difiere de forma significativa con la CF que se administró 24 h antes de la eutanasia y con los dos tratamientos con BL en ambas variables. No se observó diferencias significativas entre la CF que se administró 24 h antes de la eutanasia con los dos tipos de tratamientos en los que se administró la BL.

En esta Tabla además, se observan los resultados pertenecientes a las aberraciones cromosómicas de tipo estructural, principalmente aquellas aberraciones que este tipo de ensayo es capaz de detectar con alta especificidad (Tice y col., 1994) y dentro de éstas se destacan un alto número de aberraciones de tipo cromatídica dado por rupturas, tal y como está descrito por estos dos mutágenos. Se evidenció diferencias significativas en los resultados que se obtuvieron entre la CF que se administró a las 48 y 24 h antes de la eutanasia con respecto al otro esquema de tratamiento de este mismo mutágeno y con respecto a la BL en los dos tipos de tratamientos. Los otros grupos de tratamiento no difirieron significativamente entre ellos.

Los resultados que se obtienen con el uso de la CF 48 y 24 h antes de la eutanasia, coinciden con los obtenidos con el uso de ratones BALB/c en ambos sexos en esta técnica citogenética (Gutiérrez y col., 2010; 2012); no siendo así, con los que se observaron a una sola administración del mutágeno 24 h antes de la eutanasia.

Este ensayo se concibió para detectar sustancias que inducen aberraciones de tipo estructural y cromatídica en su mayor expresión. En tal sentido, los resultados obtenidos en ambos mutágenos y sus variantes de tratamiento corroboran dicha hipótesis, ya que la mayoría de las células con aberraciones son de tipo estructural, cromatídicas dadas por rupturas (Tice y col., 1994; Preston y col., 1999; OECD, 2009).

La explicación de que los valores encontrados en los animales tratados con CF, 48 y 24 h antes de la eutanasia difieran con los animales administrados a las 24 h antes de la misma, está dada porque la CF constituye un promutágeno, para manifestar su efecto genotóxico es necesario que

Tabla 20. Frecuencia inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	Aberraciones/1 000 células/grupo ^b				# de Células con aberraciones ^b
				Cromosómicas		Cromatídicas		
				Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
Machos								
CN	5,99 ± 0,61	1	5	0	0	7	4	11
CF1	3,82 ± 0,31ab*	16cd*	50cd*	5cd*	19cd*	138cd*	16cd*	178cd*
CF2	4,77 ± 0,13*	10*	33*	2	8*	102*	10*	122*
BL1	4,74 ± 0,21*	11*	37*	3*	10*	108*	9*	130*
BL2	5,10 ± 0,10*	7*	31*	2	8*	101*	10*	121*
Hembras								
CN	5,90 ± 0,42	2	3	0	0	6	2	8
CF1	3,90 ± 0,65ab*	19cd*	40cd*	6cd*	21cd*	149cd*	23cd*	199cd*
CF2	4,80 ± 0,06*	7*	28*	1	6*	115*	14*	136*
BL1	4,82 ± 0,14*	10*	33*	2	9*	111*	17*	139*
BL2	5,15 ± 0,06	9*	30*	2	7*	113*	12*	134*

^aX ± D.E, de un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas. Diferencias significativas (^ap<0,05; ANOVA), estas letras difieren para (a) comparación entre mutágenos para el mismo sexo y (b) comparación entre los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo. Diferencias significativas (^bp<0,01; prueba no paramétrica χ^2), estas letras difieren para (c) comparación entre mutágenos para el mismo sexo y (d) comparación entre los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo. CF1=ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. CF2=ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia. BL1=bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. BL2=bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia. * Difiere contra el CN=Control negativo. IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.

sea metabolizada por el hígado, al menos por las enzimas de fase I y de fase II. El tiempo constituye un factor importante y determinante del potencial mutagénico y genotóxico de este clastógeno químico; por lo cual, la CF en ensayos *in vitro* se utiliza en diseños donde se añade al cultivo la mezcla microsomal hepática S9, para de esta forma mimetizar lo ocurrido en el hígado de roedores (Mosley y col., 2007; Vasquez, 2010; Mishra, 2012).

En cuanto a la BL no hubo diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos, ya que constituye un verdadero mutágeno, este antineoplásico tal y como se administra es capaz de ejercer su efecto mutagénico a altas dosis al metabolizarse por el hígado en poco tiempo, no como la CF, donde el metabolito activo que se crea de la metabolización en el hígado de este fármaco, es el de mayor efecto mutagénico y genotóxico, causante del daño (Bólan y col., 2008; 2011).

Al analizar los resultados entre mutágenos (CF y BL), se observó que solo difirió significativamente la CF que se administró 48 y 24 h antes de la eutanasia con ambos tipos de tratamientos en que se utilizó la BL. Con esto se demuestra que la CF que se administró en dos ocasiones (48 y 24 horas antes de la eutanasia), bajo las condiciones experimentales ensayadas induce mayor número de aberraciones numéricas y estructurales, fundamentalmente por el tipo de daño que induce este mutágeno, a consecuencia de mecanismos reparativos de la célula (Cancino y col., 2001).

Mecanismos reparativos que son fijados en las células somáticas y por lo general constituyen procesos irreversibles y trasmisibles a la próxima generación de fijarse igualmente en espermatogonias. Este efecto mutagénico induce mayor daño que el de la BL, siendo este último un agente químico radiomimético. La BL se une al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo activado genera radicales libres que se encargan de la ruptura, lo cual trae consigo la aparición de aberraciones, sobre todo rupturas de cromátides, huecos, fragmentos y translocaciones (Mani y col., 1995; Prieto y col., 1999; Bólan y col., 2008; 2011).

Conclusión parcial

El mejor diseño experimental para inducir un número considerable de aberraciones cromosómicas en ratones BALB/c de ambos sexos, lo constituye la administración de ciclofosfamida en dosis de 50 mg/kg por vía i.p, a las 48 y 24 h antes de la eutanasia.

4.2.4. Evaluación del efecto genotóxico de la ciclofosfamida y la bleomicina en ratones BALB/c machos como biomodelos de antigenotoxicidad en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide

Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los animales controles negativos y los que se administraron con la CF y BL, tanto en los resultados de la concentración espermática como en los del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide (Tabla 21). Estos resultados corroboran el efecto genotóxico de ambos mutágenos y la inocuidad del NaCl al 0,9%. Además, este estudio permitió corroborar que el rango espontáneo de la concentración espermática en esta especie se encuentra entre $1,94-2,56 \times 10^6$ células/mL y el número de cabezas anómalas esta entre 8,7-16,1 en 500 células registradas.

La CF disminuyó la concentración espermática con valores entre $0,39-1,19 \times 10^6$ células/mL y un número de cabezas anómalas entre 94,2-106,8 igualmente en 500 células registradas. En los animales que se trataron con la BL, se obtuvieron valores como promedio en la concentración espermática en las dos réplicas experimentales entre $1,10-1,90 \times 10^6$ células/mL y 47,2-61,6 espermatozoides con cabezas anómalas en 500 células totales leídas.

Los resultados que se obtuvieron en los animales que se trataron con la CF difirieron de forma significativa con los obtenidos en los animales que se trataron con la BL, en cuanto a los resultados en la concentración espermática, como índice de citotoxicidad, como en los del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, como índice de genotoxicidad.

En el diseño experimental que se realizó en este estudio se incluyó un grupo control negativo (NaCl al 0,9 %), para corroborar los resultados de inducción obtenidos con el uso de ambas sustancias mutagénicas.

Estos resultados difieren significativamente con los que encontraron Curbelo y col., (2011); Rivero y col., (2012); en ratones NMRI y Domínguez y col., (2009) en ratones OF-1, teniendo en cuenta los valores controles y los valores que se observaron en animales que se trataron con la CF como mutágeno en este ensayo.

Al comparar los resultados entre mutágenos teniendo en cuenta la concentración espermática, se experimentó una mayor tendencia a disminuir esta variable por parte de la CF, en la cual, se obtuvieron rangos más bajos de concentración espermática y número de espermatozoides con cabezas normales bajos, por lo que se obtuvo un mayor efecto citotóxico y genotóxico (Tabla 21).

Tabla 21. Efecto de la ciclofosfamida y bleomicina en la concentración de espermatozoides y la aparición de cabezas de espermatozoides anómalas de ratones BALB/c.

Grupos	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	Concentración*(10 ⁶) Células/mL.	% EGC
CN*	487,60±3,75	12,40±3,76	7,13±5,20	1,71±1,2	3,10±2,7	0,50±0,26	2,25 ± 0,31	4,56±2,08
CF*	399,51±12,34 ^{ab}	100,50±6,33 ^{ab}	39,10±6,86 ^{ab}	22,11±3,79 ^{ab}	29,91±6,15 ^{ab}	9,40±2,09 ^{ab}	0,79 ± 0,43 ^{ab}	28,45±5,45 ^{ab}
BL*	445,63±7,26 ^a	54,42±7,28 ^a	20,30±3,01 ^a	13,00±2,92 ^a	16,51±3,22 ^a	4,62±0,22 ^a	1,50 ± 0,42 ^a	12,52 ± 4,99 ^a

CN: Control negativo NaCl 0,9 %. CF: Ciclofosfamida 50 mg/kg. BL: Bleomicina 20 mg/kg). *Administración por vía i.p, durante 5 días.

Determinaciones en 500 células/animal. ^adifiere para p<0,05 (comparación con el control negativo, ANOVA), ^bdifiere para p<0,05 (comparación entre mutágenos, ANOVA).

(**X** media; **DE** desviación estándar, para las dos réplicas analizadas). %EGC: Porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática.

Estos resultados están en conjunción con los obtenidos por otros autores, los cuales plantean que la CF es un mutágeno que crea metabolitos activos que logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, que disminuye la producción y maduración de estas, al tener en cuenta a su vez, un efecto endocrino gonadal directo (Domínguez y col., 2009; Curbelo y col., 2011; Gutiérrez y col., 2010; Gutiérrez y col., 2012; Rivero y col., 2012).

La CF indujo mayor número de cabezas morfológicamente anómalas, resultados que están en conjunción con los hallados en la determinación de la concentración espermática en epidídimos (Domínguez y col., 2009; Gutiérrez y col., 2010; Curbelo y col., 2011; Gutiérrez y col., 2012; Rivero y col., 2012).

La BL indujo menor acción citotóxica y genotóxica, teniendo en cuenta, la concentración espermática y la morfología de la cabeza de espermatozoide de epidídimos, lo cual no descarta su conocido efecto sobre la fertilidad, al producir estrés oxidativo en células germinales (Park y col., 2009).

Los resultados bajos obtenidos con la BL demuestran una vez más el mayor uso y consideración de la CF como mutágeno; siendo esta altamente inductora de cabezas de espermatozoide anómalas, ya que el mayor efecto que se conoce por la BL es la inducción de labilidad y ruptura de la estructura primaria del ADN, produciendo radicales libres, razón por la cual, se utiliza la BL con mayor frecuencia como mutágeno en el ensayo cometa y en evaluaciones que tienen en cuenta los efectos dañinos al ADN por estrés oxidativo (Cancino y col., 2001).

Se obtuvo en mayor proporción la aparición de espermatozoides amorfos y sin gancho con el uso de la CF, justificando el uso de esta en protocolos de genotoxicidad, en cuanto a la ocurrencia de un gran número de espermatozoides amorfos y en protocolos de fertilidad como control positivo, al inducir aumento en la aparición de espermatozoides sin gancho que impiden realizar la fecundación con efectividad y la aparición de fetos con malformaciones (Porter y Singh, 1998; Park y col., 2009).

En cuanto a la BL, en mayor número se obtuvo la aparición de espermatozoides amorfos y sin gancho, en similitud con los que se obtienen con la CF, pero en menor proporción, siendo significativamente diferentes de forma estadística y biológica (Tabla 21).

El uso de los 4 modelos *in vivo* de antígenotoxicidad discutidos en los epígrafes del 4.2.1 al 4.2.4, permitirá evaluar el efecto antígenotóxico de nuevos ingredientes activos, aunque cabe destacar,

que se puede recomendar la evaluación del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet en estos biomodelos, pues existen evidencias de que este extracto es antígenotóxico y radioprotector en modelos *in vitro* (Crespo y col., 2012); permitiendo el posible uso de este extracto en terapias combinadas con fármacos citostáticos para pacientes con cáncer, los que constituye una de las principales aplicaciones del desarrollo *in vivo* de modelos experimentales.

En un estudio realizado por Crespo y col., (2012), se evaluó el potencial de este extracto oleoso para proteger la integridad celular de los efectos adversos de la radiación gamma y la bleomicina, en particular, con los asociados al daño del ADN, la lipoperoxidación y la pérdida de la integridad mitocondrial. Con este fin se realizó el ensayo SOS Chromotest (con y sin activación metabólica), así como los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica y de actividad enzimática mitocondrial en eritrocitos humanos (sin activación metabólica) (Rosario y col., 2009).

Las concentraciones del extracto ensayadas fueron: 50, 200, 350, 500 y 1 000 µg/mL frente a dosis de radiación de 150 Gy (SOS Chromotest), 250 Gy (eritrocitos) y 15 mg/mL de bleomicina (Rosario y col., 2009). En todos los ensayos se evaluaron esquemas de pre, co y post-tratamiento (Rosario y col., 2009). Los resultados obtenidos demostraron que el extracto oleoso protege al ADN a dosis mayores a 200 µg/mL, en las variantes de co y post-tratamiento (Crespo y col., 2012). Además, protege las membranas celulares de eritrocitos humanos de la acción de los lipoperóxidos, inducidos por la acción de la radiación gamma, con dosis mayores a 200 µg/mL; y es capaz de proteger las mitocondrias y con ello, la viabilidad celular de eritrocitos humanos, de la acción de la radiación gamma (con dosis mayores a 200 µg/mL) y la bleomicina (con dosis mayores a 500 µg/mL) (Crespo y col., 2012).

Los resultados obtenidos por Crespo y col., 2012 nos permiten recomendar la evaluación de este producto en estudios preclínicos *in vivo* de antígenotoxicidad con el objetivo de utilizarlo para mitigar los daños generados por las terapias antineoplásicas.

Conclusión parcial

Se obtuvo mayor resultado de inducción de cabezas de espermatozoides anómalas con el uso de la ciclofosfamida, en comparación con la bleomicina, a la dosis, diseño y vía utilizada; aunque es posible también emplear la bleomicina como control positivo.

4.3. Evaluación del efecto genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet a diferentes niveles de expresión de daño al ADN utilizando la línea murina más sensible

4.3.1. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley

Los resultados de los diferentes niveles de daño determinados mediante el ensayo cometa, el número de unidades arbitrarias y la longitud de migración del daño al ADN se muestran en la Tabla 22.

El porcentaje de nucleoides de grado 0 en los animales controles estuvo entre 78,21-81,12 como promedio entre ambos sexos. Este mismo porcentaje fue de 79,14-80,10 como promedio en ambos sexos para el caso de los animales que se trataron con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* en la dosis más baja administrada (400 mg/kg). En la dosis más alta administrada de este extracto (2 000 mg/kg) se obtuvieron valores como promedio entre 76,44-77,46%.

Los valores del porcentaje de nucleoides de grado 4 de daño en los animales del grupo control estuvieron entre 0,98-1,02. En los animales que se trataron con la dosis mínima del extracto (400 mg/kg), este porcentaje estuvo entre 1,22-1,31. Los valores de la dosis máxima que se utilizó fue similar con los de los grupos controles y la dosis más baja utilizada en el extracto, la cual estuvo entre 1,44-1,61%.

Los valores del porcentaje de nucleoides con grado 0 de daño al ADN que se encontró en los animales tratados con CF fueron más bajos que los valores de los diferentes grupos de tratamientos en que se administró el extracto, valores que estuvieron entre 30,25-31,33% en ambos sexos. Sin embargo, los valores de nucleoides con grado 4 de daño al ADN estuvieron más altos que los encontrados en los animales que se trataron con el extracto, con valores entre 3,55-3,90%, los cuales difieren estadísticamente con controles y tratados ($p < 0,05$).

Se reportó que los valores más altos de daño al ADN que se logran con el uso de la CF como mutágeno son los del porcentaje de nucleoides con nivel de daño 1 y 2.

El número de unidades arbitrarias en los animales controles estuvieron entre 30,51-35,03, y en los animales que se trataron con la dosis máxima en la que se utilizó el extracto los valores

Tabla 22. Ensayo cometa en ratas Sprague Dawley de ambos sexos en la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica con el extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* Aublet administrado vía oral durante 14 días.

Grupos	Sexo	LM-ADN (μm)	Unidades Arbitrarias	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
				(% Nucleoides)				
CN	H	50,41 \pm 3,99	30,51 \pm 14,10	81,12 \pm 4,35	10,47 \pm 3,18	5,17 \pm 2,90	2,26 \pm 1,43	0,98 \pm 0,44
	M	52,88 \pm 4,28	35,03 \pm 8,90	78,21 \pm 9,10	13,19 \pm 4,77	4,98 \pm 2,33	2,60 \pm 1,26	1,02 \pm 0,83
CF	H	79,69 \pm 8,11*	106,93 \pm 15,66*	31,33 \pm 3,64*	45,09 \pm 2,33*	12,80 \pm 3,32*	6,88 \pm 1,34*	3,90 \pm 1,23*
	M	74,42 \pm 10,08*	105,71 \pm 13,11*	30,25 \pm 2,41*	46,99 \pm 3,26*	13,11 \pm 2,97*	6,10 \pm 1,06*	3,55 \pm 2,50*
ECG (400 mg/kg)	H	54,41 \pm 4,21	34,80 \pm 10,24	79,14 \pm 4,32	11,86 \pm 5,02	5,37 \pm 3,10	2,32 \pm 1,01	1,31 \pm 1,00
	M	57,10 \pm 1,28	33,46 \pm 7,51	80,10 \pm 5,22	11,23 \pm 5,56	5,00 \pm 2,89	2,45 \pm 1,20	1,22 \pm 0,98
ECG (1 000 mg/kg)	H	55,72 \pm 2,12	33,19 \pm 10,31	80,46 \pm 6,59	10,78 \pm 5,11	5,17 \pm 3,15	2,29 \pm 1,51	1,30 \pm 0,99
	M	52,33 \pm 5,01	33,58 \pm 8,11	79,20 \pm 3,42	12,09 \pm 4,16	4,85 \pm 3,28	2,51 \pm 1,10	1,35 \pm 0,68
ECG (2 000 mg/kg)	H	55,91 \pm 3,44	35,61 \pm 7,33	77,46 \pm 5,10	15,12 \pm 2,96	3,21 \pm 3,01	2,77 \pm 1,33	1,44 \pm 1,12
	M	57,01 \pm 2,21	37,27 \pm 5,82	76,44 \pm 6,00	15,57 \pm 2,31	3,88 \pm 2,99	2,50 \pm 1,03	1,61 \pm 0,53

Todo el análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de U de Mann Whitney, $p < 0,05$, (X =media; DE =Desviación estándar). CN=Control negativo (Tween 65, 2%). CF= Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia, ¹administración vía i.p. ECG=Extracto de *Carapa guianensis* vía oral durante 14 días. *Difiere contra el grupo control negativo teniendo en cuenta el mismo sexo. LM: Longitud de migración del ADN. H: Hembras. M: Machos.

estuvieron entre 35,61-37,27. Estos resultados fueron similares en ambos grupos experimentales, los cuales no difirieron estadísticamente ($p < 0,05$). Sin embargo, los valores de los animales que se trataron con la CF fueron más altos y difieren con el grupo control y con los grupos que se trataron con el extracto en los diferentes niveles de dosis, con valores entre 105,71-106,93 en ambos sexos.

La longitud de migración del ADN fue similar entre controles y tratados con el extracto con valores entre 50,41-57,10 μm para ambos sexos. Sin embargo, los animales que se trataron con la CF experimentaron un incremento considerable en la longitud de migración de daño, por lo cual se infiere mayor número de rupturas en las cadenas simples del ADN, con valores entre 74,42-79,69 μm .

En ninguna de las variables que se analizaron se observó diferencias significativas al realizar una comparación entre sexos, este resultado fue válido para todos los grupos experimentales, así como tampoco se encontró diferencias entre dosis del extracto, por lo que se puede concluir que no hubo dosis dependencia.

La Figura 11 de la a-ñ muestra los niveles de daño en el grupo control disolvente, los del grupo que se trató con la CF como control positivo y los que se trataron con la dosis máxima del extracto (2 000 mg/kg). La degradación total del ADN se observa en la Figura 11ñ, la cual corresponde a un animal que se administró con CF en dos dosis por vía i.p.

Los resultados de la Tabla 22 demuestran que el extracto evaluado no causa daño en la estructura primaria del ADN. Varios autores declaran los diversos usos biomédicos del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis*, y la toxicidad sistémica aguda y a dosis repetida (Costa y col., 2008), sin embargo, el reporte del potencial genotóxico a la estructura primaria del ADN mediante el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica es novedoso.

Alonso y col., (2012) demostraron que los componentes del extracto protegen al ADN de los daños que causa la CF, este extracto produce una disminución considerable de la formación de especies reactivas del oxígeno, al evaluarse en co-administración del extracto en dosis farmacológicas entre 100-400 mg/kg en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica en ratas SD de ambos sexos (Alonso y col., 2012).

Los resultados en todos los grupos que se trataron con el extracto fueron similares a los encontrados por González y col., (2002), en las UA, longitud de migración del ADN y el

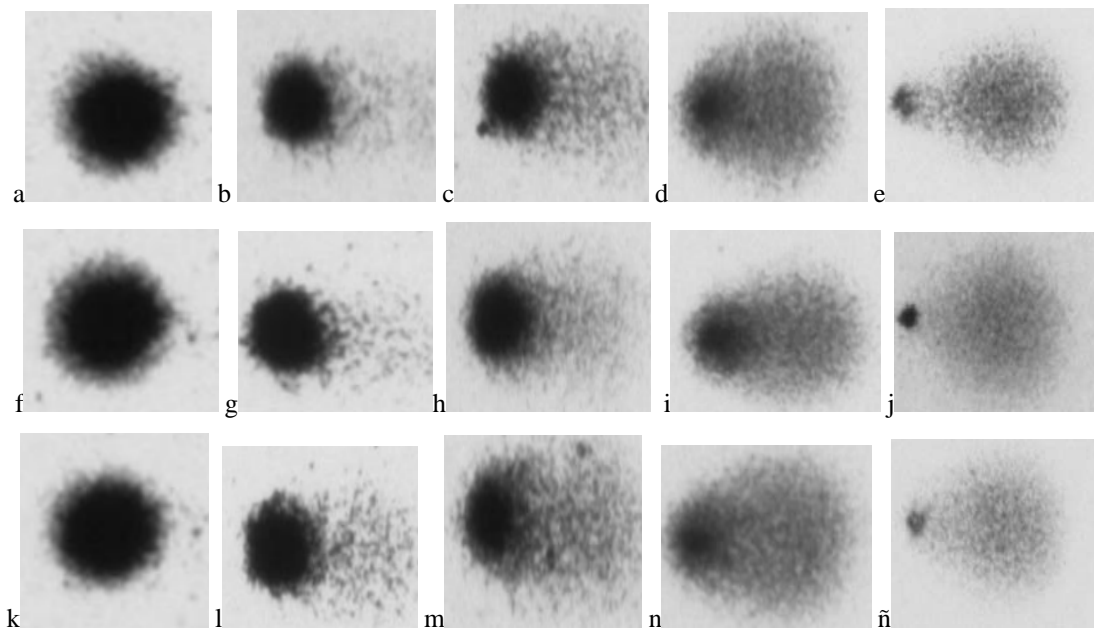


Figura 11 (a-e) Grupo Control negativo (tratado con Tween 65 al 2%), nivel o grado de daño al ADN de 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha. **(f-j)** Grupo tratado con 2 000 mg/kg del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet vía oral, nivel de daño al ADN de 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha. **(k-ñ)** Grupo tratado con ciclofosfamida vía i.p, nivel de daño al ADN de 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha.

porcentaje de daño al ADN en sus diferentes niveles en el grupo control negativo, donde se evaluó el efecto de la administración oral con D-003 en el ADN de leucocitos y células hepáticas de ratas SD (González y col., 2002).

El daño que indujo la CF está acorde con los declarados en la literatura, cuando se utiliza este mutágeno como control positivo en ensayos de genotoxicidad en diseños experimentales con la misma vía y dosis y línea de rata (Alonso y col., 2012).

La CF fue capaz de duplicar los resultados de los controles y los tratados con el extracto en todas las variables que se analizaron, pero su mayor incremento se observó en el porcentaje de nucleoides de nivel 1 y 2. El incremento significativo de leucocitos con una longitud de migración del ADN larga en los animales que se trataron con la CF revela un incremento en la ruptura de las hebras del ADN (González y col., 2002; Lillford y col., 2010; Mishra, 2012).

Se conoce que los extractos oleaginosos ricos en ácidos grasos insaturados como componentes mayoritarios, no causan daño al ADN medido por el ensayo cometa (Marrero y col., 2007; Gutiérrez y col., 2012). Estudios previos demuestran que los terpenoides son usualmente genotóxicos, aunque esto no significa que los extractos que tienen este compuesto también tengan esta característica, pues depende de su proporción en la mezcla total.

Alonso y col., (2012), estudiaron el efecto al ADN de este extracto, co-administrado con CF, mediante el ensayo cometa *in vivo* en ratas Sprague Dawley, para demostrar que el extracto puede proteger al ADN del daño oxidativo generado por la CF, donde no hubo diferencias entre los animales que se trataron con el extracto y los que se co-administraron con CF, además se demostró que no había dosis dependencia.

El extracto fue capaz de revertir en todos los casos el daño por estrés oxidativo que se logró en el esquema de tratamiento propuesto y que se discutió en el acápite 4.2.1 del objetivo específico número 2, al utilizar la CF en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre administraciones por vía i.p en dosis de 50 mg/kg. Resultados similares en base a la no presencia de genotoxicidad obtuvieron González y col., (2002); Marrero y col., (2007), con el uso de extractos naturales con componentes mayoritarios similares al extracto que se evaluó en este experimento.

El D-004, extracto lípidico que se obtiene de la Palma Real cubana (*Roystonea regia*) es rico en ácidos grasos poliinsaturados, este extracto tampoco fue genotóxico, cuando se evaluó en el ensayo cometa alcalino en ratones NMRI de ambos sexos, administrado en dosis repetidas

durante 14 días (Marrero y col., 2007).

El Vimang[®], extracto que se obtiene de la corteza del Mango (*Mangifera indica* L) es rico en polifenoles y terpenoides, no evidenció potencial genotóxico al evaluarse en una batería completa de ensayos de genotoxicidad, que incluyó el ensayo cometa celular y acelular, además se evaluó la actividad genotóxica de este extracto en el ensayo SOS y tampoco causó daño al ADN de células procariotas (Rodeiro y col., 2006; Rosario y col., 2009).

Los resultados que se obtienen en este ensayo en los animales que se trataron con el extracto fueron similares a los que obtuvo González y col., (2002), con la administración del D-003 extracto rico en ácidos alifáticos primarios de alto peso molecular purificada de la cera de la caña de azúcar. Las propiedades antioxidantes de este extracto se demostraron, así como su capacidad de inducir daño al ADN en ratas SD mediante el ensayo cometa.

No se determinaron los mecanismos mediante los cuales el extracto que se evaluó logra disminuir el ambiente oxidativo o Redox de la CF, no obstante, los resultados experimentales sugieren una disminución en los niveles de daño del ADN cuando se indujo estrés oxidativo con CF (Alonso y col., 2012). Se conoce que el metabolismo a nivel hepático de los ácidos grasos genera especies reactivas del oxígeno (EROS), como consecuencia de la beta-oxidación, lo cual daña al ADN (Lazarow, 1978).

Los resultados que obtuvieron Alonso y col., (2012), aseveran que el tratamiento con el extracto oleaginoso del *Carapa guianensis* bajo las condiciones experimentales que se ensayaron no causan aumento de EROS o cualquier otro compuesto que a altas concentraciones aumente la ruptura de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcalis en el ADN. Durante la conducción de este estudio se demostró la capacidad antioxidante del extracto induciendo cambios en la actividad de la enzima catalasa, la más importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y principal generador de EROS durante la beta oxidación, lo cual sugiere efectos antioxidantes importantes de este extracto (Alonso y col., 2012).

Se confirma que algunos flavonoides y sustancias antioxidantes como los terpenoides, diosminum y quercetina corrigen la leucopenia y trombocitopenia inducida por la CF en ratas (Lahouel y col., 2004), además pueden reducir los niveles de peroxidación lípidica y aumentar las concentraciones de glutatión en el hígado, resultados similares se obtuvieron al utilizar este extracto (Alonso y col., 2012).

Conclusión parcial

El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet no posee actividad genotóxica *in vivo*, medido mediante el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica en el biomodelo ratas Spaque Dawley de ambos sexos.

4.3.2. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratones BALB/c

No ocurrieron muertes durante el estudio ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas entre los grupos administrados con el extracto y los controles, en cuanto al índice de citotoxicidad (EP/EN), frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (Tabla 23) y número de EP, con 1, 2 o más MN (Tabla 24), no siendo así para los grupos que se administraron con CF en los cuales sí se encontró diferencias significativas.

Los resultados que se aprecian en la Tabla 23 demuestran que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 14 días en ratones BALB/c de ambos sexos mantuvo los índices espontáneos del número de micronúcleos en células de la médula ósea, de igual forma no interfirió en la división celular, según el índice de citotoxicidad EP/EN.

El índice EP/EN, indicador de la proliferación celular en médula ósea, fue estadísticamente similar en los grupos que se trataron con el extracto y el control, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a todas las dosis (Costa y col., 2007). Sin embargo, los valores de este índice en los ratones que se trataron con CF fueron estadísticamente significativos al compararlo con los controles y los tratados.

La frecuencia de aparición de EP con MN se comportó de forma similar en los animales controles en comparación con los tratados con el extracto oleoso, incluyendo la máxima dosis que se administró de 2 000 mg/kg (Figura 12). En este último, los valores son consistentes con los declarados por Lóriga y col., (2001); Fernández y col., (2005); Gutiérrez y col., (2012), pero difieren, pues no es la línea BALB/c la de mayor uso, condicionado fundamentalmente por el costo, pues otras líneas no isogénicas son más baratas, pero menos eficientes (Arencibia y col., 2012). El grupo control positivo CF mostró una frecuencia de EP con MN alta y mayor que en los restantes grupos (Tabla 24), lo que representa una evidencia de rupturas cromosómicas o daño en

Tabla 23. Efecto del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el 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.

Grupos	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
CN	5	1079 ± 10,1	921 ± 11,0	1,17 ± 0,02	0,18 ± 0,04
CF	5	925 ± 27,2*	1075 ± 26,2*	0,86 ± 0,02*	1,77 ± 0,93*
ECG (400 mg/kg)	5	1080 ± 13,3	920 ± 13,2	1,17 ± 0,03	0,22 ± 0,02
ECG (1 000 mg/kg)	5	1074 ± 14,8	926 ± 14,5	1,16 ± 0,03	0,23 ± 0,02
ECG (2 000 mg/kg)	5	1070 ± 17,0	930 ± 17,0	1,15 ± 0,05	0,19 ± 0,03
Hembras					
CN	5	1066 ± 16,9	934 ± 16,9	1,14 ± 0,05	0,15 ± 0,05
CF	5	918 ± 19,2*	1082 ± 19,2*	0,85 ± 0,01*	1,71 ± 0,84*
ECG (400 mg/kg)	5	1060 ± 17,0	940 ± 17,0	1,13 ± 0,03	0,18 ± 0,03
ECG (1 000 mg/kg)	5	1069 ± 15,1	931 ± 15,1	1,14 ± 0,03	0,15 ± 0,05
ECG (2 000 mg/kg)	5	1072 ± 17,6	928 ± 17,6	1,16 ± 0,02	0,16 ± 0,05

Determinaciones en 2 000 células/animal, *p<0,05 (comparación con el control, ANOVA). (X media; DE desviación estándar). CN= Control negativo. CF= Control positivo: Ciclofosfamida 50 mg/kg i.p. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 14 días). EP: Eritrocitos policromáticos. EN: Eritrocitos normocromáticos. MN: Micronúcleos.

Tabla 24. Efecto del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el 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.

Grupos	n	MN	EP (1 MN)	EP (2 MN)	EP (+2 MN)
Machos					
CN	5	26	19	7	0
CF	5	253*	164*	72*	17*
ECG (400 mg/kg)	5	31	20	9	2
ECG (1 000 mg/kg)	5	33	22	10	1
ECG (2 000 mg/kg)	5	27	17	8	2
Hembras					
CN	5	21	14	5	2
CF	5	244*	158*	66*	20*
ECG (400 mg/kg)	5	25	16	8	1
ECG (1 000 mg/kg)	5	22	18	4	0
ECG (2 000 mg/kg)	5	23	15	7	1

Determinaciones en 2 000 EP/animal, *p<0,01 (comparación con el control, Prueba de χ^2). CN= Control negativo. CF= Control positivo: Ciclofosfamida 50 mg/kg i.p. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 14 días). EP: Eritrocitos policromáticos. MN: Micronúcleos.

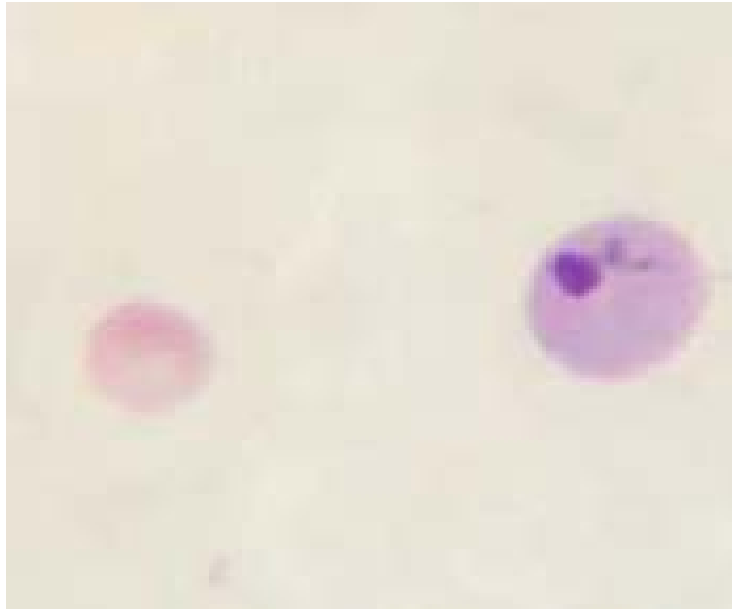


Figura 12. Eritrocito policromático con un micronúcleo perteneciente a una muestra de un animal del grupo tratado con 2 000 mg/kg del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet vía oral, magnificación 400X.

el aparato del huso mitótico (OECD, 1997; 2009).

El número de EP con 1, 2 o más MN también fue similar en los grupos que se administraron con el extracto y los controles, y mayor en los animales que se administraron con CF. El aumento que se encontró en el grupo que se administró con CF evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración que se empleó (Fernández y col., 2005; Gutiérrez y col., 2012; Rivero y col., 2012), así como la fiabilidad y sensibilidad de este biomodelo (Ryabchenko y col., 2013). Resultados similares de inducción obtuvieron Carvalho y col., (2011) y Reddy y col., (2011), al utilizar la CF como control positivo y evaluarlo como un potente agente en la formación de micronúcleos.

Es importante comentar que la ausencia de efecto mutagénico y citotóxico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* que se observó en este estudio no se relaciona con una inadecuada exposición a la sustancia ensayo, ya que las dosis de este producto entre 100 y 350 mg/kg, inferiores a las que se utilizaron en este estudio, producen efectos farmacológicos importantes (Ambrozin y col., 2006; Ferrari y col., 2007; Gonçalves y col., 2009; Tonini y col., 2005; Alonso y col., 2012).

Además, se utilizó la dosis máxima que se recomienda (2 000 mg/kg) para este ensayo tanto en esquemas de dosis única como repetidas durante 14 días. Esta dosis se recomienda para los ensayos de dosis únicas donde la toma de muestra se realiza entre las 24 y las 48 h post-tratamiento, al utilizarse la médula ósea, con una población celular extremadamente proliferativa, de corto ciclo, además de ser un tejido muy vascularizado que permite el acceso rápido de las sustancias a evaluar (Tice y col., 1994; OECD, 1997; 2009; Vazquez, 2010). Por tanto, el empleo de esta dosis administrada durante más tiempo descarta que la exposición a la sustancia fuese insuficiente.

Conclusión parcial

La administración por vía oral de dosis repetidas del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) durante 14 días no aumentó la frecuencia de células en médula ósea con micronúcleos, ni modificó el índice de citotoxicidad (EP/EN), lo que indica que no presenta actividad genotóxica, ni citotóxica, sobre las células de la médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelo experimental.

4.3.3. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de aberraciones cromosómicas en eritrocitos de médula ósea de ratones BALB/c

Los resultados de la evaluación del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el ensayo de aberraciones cromosómicas se muestran en la Tabla 25.

No hubo diferencias significativas entre controles y tratados con el extracto, en ninguno de los parámetros numéricos y estructurales medidos mediante este ensayo en ambos sexos. Sin embargo, en los animales que se trataron con la CF sí se observó un aumento considerable de aberraciones cromosómicas de ambos tipos, estos resultados difirieron con el grupo control y los tratados por vía oral con el extracto.

El número de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales en los grupos que se trataron con el extracto, coinciden con los resultados espontáneos que se conocen para esta especie y línea en particular, teniendo en cuenta el mismo sexo (Arencibia y col., 2012). Además, el porcentaje de células con aberraciones también coincide con los que se declaran para esta especie y línea en particular en los animales que se trataron con las diferentes dosis del extracto.

Los resultados que se aprecian en la Tabla 25, demuestran que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 14 días en ratones BALB/c de ambos sexos mantuvo los índices espontáneos del número de células con aberraciones, de igual forma no interfirió en la división celular de las células evaluadas de la médula ósea en metafase (Figura 13).

Los valores del IM se mantuvieron de forma similar entre tratados con el extracto y controles negativos, se demostró que a altas dosis (2 000 mg/kg) y al administrarse de forma reiterada el extracto no interfiere en la división celular, pues no modifica los valores de IM espontáneos en la especie de ratón que se utilizó en este experimento. En este índice tampoco se observó diferencias entre sexos, por lo cual no hay sexo dependencia en cuanto a las bajas potencialidades del extracto de ser citotóxico (Gutiérrez y col., 2010). Al analizar los resultados en los animales que se trataron con la CF se observa que difirieron significativamente al compararlos con controles y tratados, este fármaco al administrarse en dos ocasiones disminuyó considerablemente la división celular.

La CF es un citostático potente que pertenece al grupo de los alquilantes de base, su uso como

Tabla 25. Efecto del tratamiento oral con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* (400-2 000 mg/kg) sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupos	IM (%) ^a (X ± D,E)	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	Aberraciones/1 000 células/grupo ^b				# CTA ^b
				Cromosómicas		Cromatídicas		
				Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
Machos								
CN	5,32 ± 0,44	2	4	0	0	6	1	7
CF	3,10 ± 0,24*	18**	36**	5**	19**	130**	26**	180**
ECG (400 mg/kg)	5,47 ± 0,35	1	5	0	0	8	1	9
ECG (1000 mg/kg)	5,25 ± 0,47	2	7	0	0	5	1	6
ECG (2000 mg/kg)	5,21 ± 0,51	1	3	0	0	7	1	8
Hembras								
CN	5,16 ± 0,37	1	2	0	0	8	1	9
CF	3,02 ± 0,29*	15**	41**	3**	20**	123**	23**	169**
ECG (400 mg/kg)	5,08 ± 0,42	2	3	0	0	9	1	10
ECG (1000 mg/kg)	5,11 ± 0,50	1	4	0	0	7	2	9
ECG (2000 mg/kg)	5,19 ± 0,18	1	4	0	0	6	2	8

^a X ± D,E, de un total de 5 animales/grupo/sexo, *p<0,05; ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, *p<0,05, ^b **p<0,01; prueba no paramétrica χ^2 , Comparación contra el control negativo (Tween 65, 2%) para ambas pruebas. # CTA= Número de células totales con aberraciones. % CA= Porcentaje de células con aberraciones. CN= Control negativo. CF= Control positivo, ciclofosfamida 50 mg/kg i.p. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (vía oral durante 14 días). IM: Índice mitótico. Gaps: Huecos de su significado en inglés.



Figura 13. Metafase organizada de una muestra de un animal tratado con 2000 mg/kg del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet vía oral, magnificación 100X.

control positivo, se utiliza ampliamente en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad (Preston y col., 1999; Fernández y col., 2005; Gutiérrez y col., 2010; 2012). Se conoce que este mutágeno no tiene especificidad por alguna fase del ciclo en particular, actúa sobre cualquiera de ellas con excepción de la G₀ (Prieto y col., 1999). Estos agentes poseen grupos químicos en su estructura que tienen la propiedad de unirse en forma covalente con elementos nucleofílicos de las células, reemplazando un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en la molécula del ADN, generalmente en el nitrógeno 7 de la guanina (Prieto y col., 1999).

La mayoría de los agentes alquilantes como la CF se consideran bifuncionales, debido a que poseen dos radicales activos que reaccionan con grupos intracadena y forman puentes con el filamento molecular helicoidal que determinan la muerte celular (Prieto y col., 1999). La actividad de la CF es máxima durante la replicación celular, cuando parte del ADN no está apareado y es más susceptible a la alquilación (Yu y col., 1999; Gomez y col., 2003).

Es por ello, que la CF es más dañina al ADN durante la fase de división celular, pues es cuando los cromosomas de la célula están más expuestos a la acción de agentes externos, por lo cual se analizan las células en metafase (Yu y col., 1999; Gomez y col., 2003). Se trata de que las células que se analizan confluyan todas en una fase puntual de la división celular, en el caso del presente estudio fue en metafase (OECD, 1997a; Yu y col., 1999; Gomez y col., 2003; OECD, 2009).

Es necesario aclarar que en esta investigación no se estudió el efecto del extracto y tampoco del mutágeno que se utilizó como control positivo en otras fases del ciclo celular.

El número de células con poliploidía tampoco difirió entre los animales que se administraron con el extracto y controles negativos. De igual forma al IM (%), la CF aumentó la aparición de esta aberración cromosómica de tipo numérica, se encontró un aumento de esta variable alrededor de 10 veces el valor reportado en controles negativos que se trataron indistintamente con Tween 65 al 2% o con NaCl al 0,9% (Fernández y col., 2005; Gutiérrez y col., 2012). Los valores que se encontraron con el uso de la CF como control positivo se encuentran dentro de los que se establecen para este mutágeno al utilizarse a la misma dosis ensayada (Gutiérrez y col., 2010; 2012).

Aunque este tipo de ensayo se diseñó solo para detectar aberraciones de tipo estructural (Tice y col., 1994; OECD, 2009), en numerosas investigaciones se establecen índices de aberraciones de tipo numérica, como las que se evaluaron en este estudio en respuesta a variables citotóxicas del

sistema a prueba, pero no de interés genotóxico, aunque por mecanismos similares pudieran tener un valor importante en la aparición de daño al ADN por mecanismos genotóxicos indirectos (OECD, 1997a; 2009).

Al evaluar el número de células con aberraciones estructurales de tipo *Gaps* se encontró valores similares entre controles y tratados con el extracto en ambos sexos. Aunque los valores en ambos sexos no difirieron en los grupos que se administraron con el extracto y en el grupo control negativo, sí se obtuvo un menor número de aparición de aberraciones tipo *Gaps* en las hembras, lo cual está acorde a lo descrito en la literatura (Shayne, 2007).

La CF nuevamente aumentó la frecuencia espontánea de aberraciones tipo *Gaps* en células de la médula ósea de ratones BALB/c, tal y como está descrito para este mutágeno (Gutiérrez y col., 2010; 2012) y como era de esperar los resultados no difirieron entre sexos, pero se observó un marcado aumento de esta aberración en las hembras.

El porcentaje de células con aberraciones en los grupos que se administraron con el extracto estuvo entre 1,20-2,00%, similares a los obtenidos en los animales que se administraron con el disolvente, resultados que no difieren entre ellos para ambos sexos. Además, coinciden con el porcentaje de células con aberraciones reportado para esta especie, pero no en el caso particular de la línea de ratón que se evaluó (Preston y col., 1999; Paz y col., 2002; Gutiérrez y col., 2010; 2012).

Por su parte, el número de células con aberraciones fue similar entre los animales que se administraron con el extracto y controles negativos. Además, los resultados en los grupos tratados estuvieron dentro del rango reportado para esta especie, pero no específicamente para la línea BALB/c, en la cual se obtuvo valores entre 0-5 % de células con aberraciones de forma espontánea (Preston y col., 1999; Paz y col., 2002; Gutiérrez y col., 2010; 2012).

En los animales que se trataron con el extracto no se observó la aparición de aberraciones de tipo cromosómica, no hubo rupturas ni tampoco intercambios. La no presencia de este hallazgo está descrito en este tipo de ensayo para productos inocuos que se comportan similar a los valores espontáneos en especies roedoras (Preston y col., 1999), trabajos con resultados similares así lo demuestran (Paz y col., 2002; Gutiérrez y col., 2010).

Estos resultados son producto a que este tipo de aberración aparece a partir de la segunda mitosis post-tratamiento y cuando el producto a evaluar posee efecto genotóxico potencial. Como es el

caso del grupo que se trató con la CF, donde los valores que se observaron de aberraciones cromosómicas difieren con controles y tratados, tanto en las de tipo rupturas como intercambios. Estos valores están acorde a los declarados para este mutágeno al administrarse por vía i.p en dosis de 50 mg/kg en dos ocasiones (Gutiérrez y col., 2010).

No se observaron diferencias significativas entre los controles y los animales que se trataron con el extracto al tener en cuenta el número de células con aberraciones cromatídicas. La mayoría de las aberraciones cromosómicas que se observaron en este estudio, en particular, en los animales que se trataron con CF, son las de tipo cromatídico, lo que se encuentra condicionado por el hecho de que la primera mitosis celular post-tratamiento es la fase más sensible para la acción de los mutágenos potenciales (Preston y col., 1999; Mishra, 2012) y corrobora que bajo las condiciones de trabajo propuestas el comportamiento del modelo fue adecuado.

Se utilizó la dosis máxima que se recomienda (2 000 mg/kg) para este ensayo tanto en esquemas de dosis única como repetidas durante 14 días. Esta dosis se propone para los ensayos de dosis únicas donde la toma de muestra se realiza entre las 24 y las 48 h post-tratamiento ya que el tejido diana, que es la médula ósea (OECD, 1997a; EPA, 1998), contiene una población de células extremadamente proliferativa, de corto ciclo celular y es un tejido muy vascularizado que permite el rápido acceso de las sustancias a evaluar (OECD, 1997a; EPA, 1998).

Conclusión parcial

La administración por vía oral de dosis repetidas del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) durante 14 días no aumentó la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas (estructurales o numéricas) ni modificó el índice mitótico, lo que indica que no presenta actividad genotóxica ni citotóxica sobre las células de la médula ósea de ratones BALB/c de ambos sexos como biomodelo experimental.

4.3.4. Evaluación de la actividad genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones BALB/c machos

No ocurrieron muertes durante el estudio ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles (Figura 14A) en las variables que miden las diferentes anomalías en la cabeza del espermatozoide (variables genotóxicas); sin embargo, en el componente que mide citotoxicidad sí hubo diferencias entre el grupo control

negativo y la dosis máxima que se administró (2 000 mg/kg) (Tabla 26). El porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática (EGC), se comportó similar entre los controles y los tratados sin diferencias significativas entre los promedios de estos.

En los grupos que se trataron con el extracto, el promedio de espermatozoides anómalos de tipo amorfo fue entre 8,33-9,89. Para el caso de los de tipo banana estuvo entre 1,00-1,70. Los espermatozoides sin gancho se presentaron en una frecuencia entre 2,00-2,20 como promedio en 500 células registrables y los que tenían dos colas se presentaron como promedio entre 0,36-0,54. El porcentaje de EGC estuvo entre 3,71-3,99 y la concentración de espermatozoides en epidídimos experimentó resultados entre $1,41-2,10 \times 10^6$ células/mL.

El grupo que se administró con CF como control positivo experimentó diferencias significativas con los controles y los tratados con el extracto, en todas las variables medidas en este ensayo, tanto en las variables que mide daño genotóxico como las que miden daño citotóxico.

Los resultados que se aprecian en la Tabla 26, muestran que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 35 días en ratones machos BALB/c mantuvo los índices espontáneos del número de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide (Figura 14B).

Los resultados que se obtienen en la morfología de la cabeza del espermatozoide en los animales que se trataron con las diferentes dosis del extracto, coinciden sin diferir con los rangos conocidos para esta especie, pero no para el caso de esta línea de ratón (Betancourt y col., 1998; Gutiérrez y col., 2012).

Los resultados de la concentración espermática en el grupo de 2 000 mg/kg difirieron con el grupo control negativo y positivo y también con los datos espontáneos de citotoxicidad que se declaran para esta línea de ratón (Arencibia y col., 2012); pero al ser la dosis más alta de 2 000 mg/kg, en la cual se encontró citotoxicidad, se declara que no tiene connotación toxicológica en este esquema en particular, pues esta dosis es 5 veces mayor que la dosis farmacológica a la cual se utiliza este extracto como antioxidante.

Resultados similares obtuvo Costa y col., (2006), cuando evaluó el extracto oleoso de esta planta en estudios toxicológicos reproductivos, donde hubo una ligera disminución de la fertilidad en ratas Wistar en la dosis máxima, sin diferir con los controles.

Varias son las causas por la cuales el extracto evaluado fue citotóxico a esta dosis. La

Tabla 26. Efecto del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones machos BALB/c.

Grupos	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas	% EGC	Concentración*(10 ⁶) células/mL
CN	488,98±4,36a	11,02±4,36a	7,11±6,03a	1,42±1,00a	2,09±2,01a	0,40±1,26a	3,68±1,57a	2,31±0,25a
CF	399,93±10,28*	100,07±4,40*	36,08±8,21*	24,77±2,66*	31,23±4,37*	7,99±1,86*	25,48±6,84*	0,82±0,16*
ECG 400 mg/kg	488,31±3,81a	11,69±3,81a	8,33±3,88a	1,00±0,94a	2,00±1,93a	0,36±1,04a	3,99±1,11a	2,10±0,20a
ECG 1 000 mg/kg	486,12±5,72a	13,88±2,72a	9,57±4,10a	1,63±1,21a	2,20±2,12a	0,48±1,33a	3,81±1,49a	1,88±0,29a
ECG 2 000 mg/kg	485,81±2,90a	14,19±2,90a	9,89±5,21a	1,70±1,27a	2,06±2,05a	0,54±1,20a	3,71±1,05a	1,41±0,21*a

Determinaciones en 500 células/animal, *p<0,05 (comparación con el control negativo, ANOVA). a=Difiere contra el control positivo (CF) con el mismo análisis estadístico. (X media; DE desviación estándar). CN= Control negativo. CF= Control positivo, ciclofosfamida 50 mg/kg por vía i,p durante 5 días consecutivos. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 35 días). EGC: Espermatozoides con gota citoplasmática.

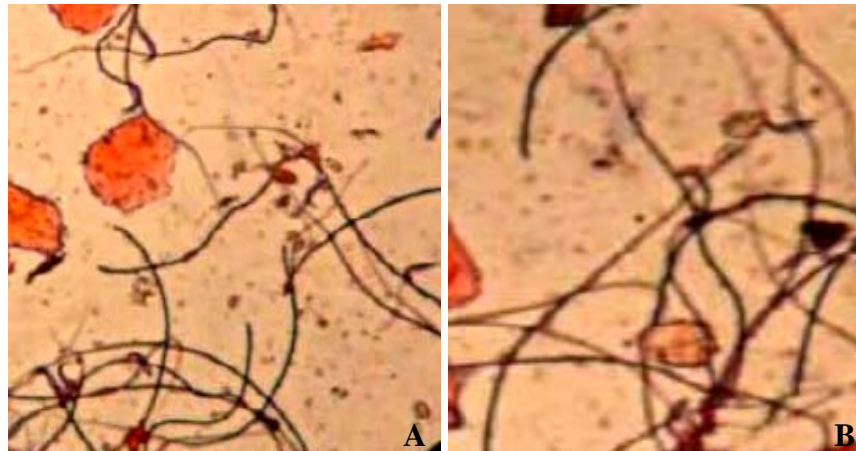


Figura 14. A: Figura de un animal del grupo Control negativo, tratado con Tween 65 al 2%, magnificación 10X. **B:** Figura de un animal del grupo tratado con 2 000 mg/kg del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet vía oral, magnificación 10X.

citotoxicidad encontrada no se relaciona con haberse administrado durante 35 días el extracto, pues el D-004, producto natural con una composición similar se administró por vía oral en dosis de 1 500 mg/kg durante 35 días a ratones OF-1 y 12 meses a ratas SD, no siendo citotóxico en células germinales (Arencibia y col., 2009; Gutiérrez y col., 2012).

Adil y col., (2013), administraron una mezcla de extractos de plantas que contenía terpenoides, flavonoides y ácidos grasos poliinsaturados, a ratas machos albinas por vía oral durante 60 y 75 días y encontraron una disminución significativa de las anomalías de la cabeza del espermatozoides provocada por diabetes tipo 2, previamente inducida a estos animales.

Mohammed y col., (2009), evaluaron el efecto mutagénico y antimutagénico de la administración crónica del extracto de *Thymus syriacus* que contenía flavonoides y polifenoles, durante 35 días en ratones machos BALB/c. Este extracto no afectó la espermatogénesis ni incrementó el número de espermatozoides anómalos, además en co-tratamiento con gencitabina, un fármaco con acción mutagénica, se comportó como un desmutágeno.

Raga y col., (2011), obtuvieron citotoxicidad en células espermáticas en ratas machos SD administradas por vía oral con un extracto de *Ardisia squamulosa* Presl, durante 10 semanas, este extracto es reconocido como anticancerígeno por su riqueza en polifenoles y flavonoides, sin embargo, la causa de la citotoxicidad encontrada puede deberse a dos de sus componentes (rapanona y la embelina), que tienen efecto antiespermatogénico, causando infertilidad y abortos en ratones (Calle y col., 2000). Por tanto, debe investigarse cuáles de los componentes mayoritarios contenidos en el extracto oleoso de *Carapa guianensis*, puede tener efecto negativo declarado o establecido ya en la literatura sobre la espermatogénesis.

Por otra parte en un estudio realizado por Curveco y col., (2014), donde se administró el extracto oleoso evaluado durante 60 días por vía oral, a ratas machos SD, evidenció una ligera disminución de la concentración espermática en la dosis 2 000 mg/kg, pero no difirió con el grupo control negativo, ni con los resultados espontáneos de concentración espermática en epidídimos de ratas de esta especie, por lo que nos hace pensar que el uso de ratones BALB/c, que es una línea más sensible y eficiente con índices espontáneos de daño espermatogénico más bajos, pueda ser la causa por la cual este extracto fue citotóxico en las células germinales de estos ratones.

En cuanto a la mayor duración de la administración del extracto, otros autores recomiendan

administrar las sustancias durante todo el ciclo espermático (Kempinas y col., 1988; Obidike y col., 2007; Laxminarayana y col., 2010), para tener una mayor noción del efecto crónico del principio activo sobre la espermatogénesis. Sin embargo, el ensayo propuesto por Wyrobek y Bruce, (1975), que establece cinco administraciones en días alternos, sacrificando a los animales 35 días después de iniciada la administración determina el efecto subagudo, por lo que constituye una desventaja de este diseño.

En un estudio del efecto del Valproato en la morfología del espermatozoide se incluyó la administración diaria hasta 60 días y se realizó el análisis de las muestras a la semana 2, 4, 5, 7, 10 y 15, de terminado el tiempo de administración (Laxminarayana y col., 2010). Por lo que, existen evidencias de diseños donde este estudio se incluye dentro de los ensayos de toxicidad subcrónica y crónica con administraciones por vía oral por tiempos que llegan a los 12 meses (Kempinas y col., 1988; Obidike y col., 2007, Arencibia y col., 2009).

El hecho de que se encuentren diferencias entre los animales que se trataron con el extracto y los controles negativos con el grupo que se administró con CF, valida la conducción del presente estudio, dándole mayor confiabilidad a los resultados expuestos. Además, estos resultados son consistentes con los que se encuentran en la literatura para la CF en esta especie e incluso al utilizar otros esquemas de tratamiento (Betancourt y col., 1998; Curbelo y col., 2011; Rivero y col., 2011; Gutiérrez y col., 2012).

El porcentaje de EGC no se modificó, este hallazgo morfológico tiene un gran componente oxidativo como indicador de fertilidad por la formación de especies reactivas del oxígeno, el cual se relaciona directamente con la aparición de infertilidad, inmadurez celular y citotoxicidad. El hecho de que el extracto no aumentó y que además, mantuvo la frecuencia espontánea de aparición de EGC en la línea de ratón que se utilizó, concuerda con las propiedades antioxidantes ya reportadas con anterioridad, al ser rico en ácidos grasos y terpenoides (Alonso y col., 2012).

El mayor porcentaje de cabezas anómalas fue del tipo amorfo, hecho que se reflejó en todas las dosis que se evaluaron del extracto. Aunque este hallazgo no difiere significativamente con los valores que se encontraron en los controles, tiene relación con el hecho de que en los ratones por lo general, existe una correlación alta entre la aparición de espermatozoides amorfos con bajos índices de fertilidad (Wyrobek y Bruce, 1975), que además se relaciona con la disminución no significativa de la fertilidad al administrarse este extracto por vía oral en dosis menores de 1 500

mg/kg de peso corporal. Sin embargo, se demostró que el extracto no causa ningún daño al embrión ni a la fertilidad de la madre durante el período de preconcepción y desarrollo embrionario (Costa y col., 2006; 2008).

Alonso y col., (2012), demostraron que los componentes del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet protegen al ADN de los daños que causa la CF, al disminuir la formación de especies reactivas del oxígeno. Esta propiedad se determinó al evaluar en co-administración el extracto en dosis farmacológicas entre 100-400 mg/kg en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica en ratas SD de ambos sexos.

En epígrafes anteriores se evaluaron los posibles daños del extracto oleoso a nivel del ADN, donde se utilizaron las bases técnicas y metodológicas del mismo ensayo que se evaluó con anterioridad, pero duplicando y triplicando la dosis farmacológica que evaluó Alonso y col., (2012), lo cual corrobora que el extracto en dosis de 2 000 mg/kg al administrarse por vía oral a ratas SD no potenció la formación de rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, así como tampoco indujo un aumento de la longitud de migración del ADN, la cual fue similar entre los controles y los tratados.

Por otro lado, la frecuencia de EP con MN en ratones BALB/c de ambos sexos tratados por vía oral durante 14 días a dosis de 400, 1 000 y 2 000 mg/kg con el extracto oleoso, fue similar a los grupos controles, no siendo así, para los grupos que se trataron con CF, en los cuales sí se encontró diferencias significativas; lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento en las dosis evaluadas (Costa y col., 2007).

En el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* se observó que no hubo diferencias significativas entre controles y tratados con el extracto en ninguno de los parámetros numéricos y estructurales que se determinaron en células de la médula ósea. La no presencia de aberraciones cromosómicas está descrito en este tipo de ensayo, para productos inocuos que se comportan de forma similar a los valores espontáneos en especies roedoras (Preston y col., 1999).

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación, demostraron que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 35 días en ratones machos BALB/c, mantuvo los índices espontáneos del número de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide, de igual forma, no interfirió en la división celular, aunque la dosis máxima que se evaluó difirió con el control negativo y con el control positivo, con resultados

intermedios en la concentración espermática. Por lo que se recomienda realizar ensayos especiales que permitan esclarecer los posibles mecanismos o las posibles causas de la aparición de citotoxicidad, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, en células germinales masculinas.

Al determinarse la actividad mutagénica *in vitro* de este extracto donde se emplearon cepas *S. typhimurium*, TA 1535 y TA 100 en el ensayo de Ames, estas cepas detectan mutaciones del tipo sustitución de pares de bases y la TA 98 lesiones por corrimiento del marco de lectura, tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica (Narciandi y col., 2013). La frecuencia espontánea de reversión no difirió con los valores promedios declarados para las cepas TA 98, 100 y 1535 (Ames y col., 1973; 1975), los controles positivos sí incrementaron significativamente la frecuencia de reversión pero ninguna de las dosis desde 5-5000 µg/placa mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo para cada cepa ni con los tratados.

Estos resultados demostraron que el extracto no se comporta como citotóxico, ni mutagénico, ni indujo mutaciones puntuales (Narciandi y col., 2013) y reafirman, aún más, los resultados de genotoxicidad negativos encontrados en la administración por vía oral del extracto que se evaluó en los ensayos genotóxicos *in vivo*.

Conclusiones parciales

1. El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) administrado por vía oral a dosis repetidas durante 35 días, no posee actividad genotóxica para inducir aumento en la frecuencia espontánea de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones BALB/c machos como biomodelo.
2. Los resultados de la concentración espermática en el grupo tratado con 2 000 mg/kg del extracto por vía oral durante 35 días difirieron con el grupo control negativo, positivo y con los datos espontáneos de citotoxicidad establecidos para esta línea de ratón, aunque este hallazgo, en el esquema evaluado y a la dosis en que se observó, no tiene connotación toxicológica.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La especie murina más sensible en las técnicas que se evaluaron fueron los ratones BALB/c, con excepción del ensayo cometa donde la más sensible fueron las ratas SD; por lo que se sugiere el uso de estas líneas para evaluar el potencial genotóxico *in vivo* de nuevos principios activos.

2. El mejor diseño para ensayos *in vivo* de antigenotoxicidad tanto, en ratas SD como en ratones BALB/c, fue donde se administró la ciclofosfamida en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones, por vía i.p en dosis de 50 mg/kg de peso, lo que permitirá evaluar nuevas moléculas con efecto antigenotóxico, siendo útiles en disímiles situaciones, tales como, terapias combinadas con fármacos citostáticos para pacientes con cáncer.

3. Se evidenció con el uso del biomodelo más sensible, que el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet no posee efecto genotóxico *in vivo* a diferentes niveles de daño al ADN, sin embargo, cuando se administró durante 35 días por vía oral en dosis de 2 000 mg/kg a ratones machos BALB/c fue citotóxico en células germinales.

6. RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

1. Utilizar la línea murina más sensible en los ensayos de genotoxicidad *in vivo* como estrategia para clasificar sustancias poco genotóxicas, o cuando haya diferencias de resultados entre los ensayos de mutagénesis y genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.
2. Evaluar la aplicabilidad del uso de los biomodelos de antigenotoxicidad utilizando la especie y línea más sensible, para nuevos principios activos con potencialidades antigenotóxicas, sentando las bases para el establecimiento de guías regulatorias para ensayos de este tipo.
3. Esclarecer el efecto citotóxico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet en células germinales masculinas, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams S, Lambert D. Earth Science: An illustrated guide to science. 10001. New York: Chelsea House Edition;2006.p.1-20.
2. Adler I, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, *et al.* Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res* 1998;417:19-30.
3. Aduloju RK, Otubanjo OA, Odeigah PG. An *In Vivo* Assay of the Mutagenic Potential of Praziquantel (PZQ) Using Sperm Head Abnormality Test. *J Hum Ecol* 2008; 23(1):59-63.
4. Adil M, Kamil H, Mohammed T, Hmood A. Protective Effect of Plants Extracts Mixture on Sperm Abnormalities, Testicular and Epididymal Tissues in Diabetic Male Rats. *Journal of Natural Sciences* 2013; 3(9):28-37.
5. Alamone MF. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Mol Mutag* 1994;23:239-40.
6. Alemán C, Más R, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, *et al.* Reference database of the main physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. *Laboratory Animals* 1997;32:457-66.
7. Almb A, Lia K, Chena H, Wangb D, Anderssonb R, Wang X. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2010;171:157-64.
8. Alonso A, Rosario LA, Arencibia DF. Evaluación pre-clínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. La Habana: IFAL-U.H;2012.p.1-58.
9. Ambrozin A, Leite A, Bueno F, Vieira P, Fernandes JB, Bueno O, *et al.* Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *J Braz Chem Soc* 2006;17 (3):542-7.
10. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutat Res* 1975;31:347-64.
11. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test

- system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci 1973;70(2):281-5.
12. Amr El-Missiry M. Antioxidant Enzyme. Rijeka: Intech Edition;2012.p.25-400.
 13. Amri H, Batt A, Siest G. Comparison of cytochrome P-450 content and activities in liver microsomes of seven species including man. Xenobiotica 1986;16:351-8.
 14. Andrade RJ, Robles M, Fernández A, López S, López MC, Lucena MI. Assessment of drug induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. World J Gastroenterol 2007;13(3):329-40.
 15. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of art. Int J Hyg Environ Health 2007;210:201-28.
 16. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, *et al.* 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 de Toxicología 2009;26(2):127-30.
 17. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A, Delgado L. Comparison in the efficiency of different murine lines for genotoxicity assays. Interdisciplinary Toxicology 2012;5(3):141-9.
 18. Armeni T, Damiani E. Lack of *in vitro* protection by a common sunscreen ingredient on UVA-induced cytotoxicity in keratinocytes. Toxicology 2004;203(1-3):165-78.
 19. AVMA. Guidelines on euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia. USA: AVMA;2000.p.1-125.
 20. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. Mutat Res 2009;674:101-8.
 21. Balkaya M, Voyvoda H, Ünsal C, Çeler H. Some hematological and biochemical characteristics of male and female Sprague-Dawley rats. 2001.p.1-15. Disponible en: <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2001-1/Makale-5.pdf>. descargado el 13 de septiembre de 2011.
 22. Bearzatto B, Servais L, Cheron G, Serge N, Schiffmann T. Age dependence of strain determinant on mice motor coordination. Brain Research 2005;1039:37-42.
 23. Bell DR, Plant NJ, Rider CG, Na L, Brown S. Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs.

Biochem J 1993;294:173-80.

24. Bernardi SF, Tarallo A, Faletti C, Oyarzabal MI. Alteraciones en el largo de la cola y su asociación con caracteres de fertilidad en ratones CF1 seleccionados por peso. *InVet* 2011;13(2):77-85.
25. 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 OF-1. *Rev Cub Plant Med* 1998;3:58-61.
26. Blasi F, Dominici L, Moretti M, Villarini M, Maurelli S, Simonetti MS, *et al.* *In vitro* genotoxicity/antigenotoxicity testing of some conjugated linoleic acid isomers using comet assay. *Eur J Lipid Sci Technol* 2012;114:1016-24.
27. Bloom JS, Ehrenreich IM, Loo WT, Lite T, Kruglyak L. Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature* 2013;494(7436):234-7.
28. Bolzán A, Bianchi M, Sánchez J. Estudios de genotoxicidad de antibióticos antitumorales en células eucariotas. *J Basic Appl Genet* 2011;22(1):1-6.
29. Bolzán AD, Bianchi MS, Giménez EM, Díaz MC, Ciancio VR. Analysis of spontaneous and bleomycin-induced chromosome damage in peripheral lymphocytes of long-haul aircrew members from Argentina. *Mutat Res* 2008;639:64-79.
30. Borges BC, Antunes-Rodrigues J, Castro M, Bittencourt JC, Elias CF, Elias LL. Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of pituitary–adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. *Horm Behav* 2007;52:508-19.
31. Bowen D, Whitwell JH, Lillford L, Henderson D, Kidd D, Mc Garry S, *et al.* Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutat Res* 2011;722:7-19.
32. Brown TA. *Genomas*. 3ª edición. Distrito Federal, México DF: Editorial Médica Panamericana;2008.p.59-78.
33. Caldji C, Diorio J, Anisman H, Meaney MJ. Maternal behavior regulates benzodiazepine/GABA receptor subunit expression in brain regions associated with fear in BALB/c and C57BL/6 mice. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1344-52.
34. Calle J, Olarte J, Pinzon R, Ospina LF, Mendoza MP, Orozco MJ. Alteration in the

- reproduction of mice induced by rapanone. *J Ethnopharmacol* 2000;71:521-5.
35. Cameán AM, Repetto R. *Toxicología Alimentaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos;2007.p.1-431.
 36. Canadian Council on Animal Care (CCAC). *Guidelines for the use of animals in Psychology*. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc;1997.p.155-62.
 37. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cub Invest Biomed* 2001;20(1):48-53.
 38. Carmignani SS, Raymund GG. Safe handling of cytotoxic drugs in the physician's office: a procedure manual model. *Oncol Nurs Forum* 1997;24(suppl 1):41-8.
 39. Carvalho I, Melo A, Dantas A, Pereira D, Costa F, Andrade T, Da Silva J. Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* 2011;720:58-61.
 40. CECMED. *Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico*. La Habana: CECMED;2012.p.1-120.
 41. Celikler S, Yildiz G, Vatan O, Bilaloglu R. *In vitro* antigenotoxicity of *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration, sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. *Biomed Environ Scien* 2008;21(6):492-8.
 42. Chahoud I, Kuriyama SN, Paumgartten FJ. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyuria in rats. *Toxicology* 2002;179:137-49.
 43. Charoensin S, Taya S, Wongpornchai S, Wongpoomchai R. Assessment of genotoxicity and antigenotoxicity of an aqueous extract of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* in *in vitro* and *in vivo* models. *Interdisc Toxicol* 2013;5(4):201-6.
 44. Chen SN, Nan FH, Chen S, Wud JF, Lu CL, Soni G. Safety assessment of mushroom β -glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. *Food Chem Toxicol* 2011;49:2890-8.
 45. Collins AR. *The Comet Assay for ADN Damage and Repair*. Principles Mol Biotech

2004;26:249-61.

46. Cooper D, Chen JM. Mutations in Human Genetic Disease. Rijeka: Intech Edition;2012.p.246-94.
47. Costa JH, Lima CR, Silva EJ, Araújo AV, Fraga MC, Ribeiro A, *et al.* Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. Journal of Ethnopharmacology 2008;116:495-500.
48. Costa JH, Lyra M, Lima CR, Arruda VM, Araújo AV, Ribeiro A, *et al.* A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology 2007;112:122-6.
49. Costa JH, Lyra M, Lima CR, Arruda VM, Araújo AV, Ribeiro A, *et al.* Estudio toxicológico reproductivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) en ratas Wistar. Acta Farmacéutica Bonaerense 2006;25(3):425-8.
50. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, *et al.* Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. Psychopharmacology 1997;132:107-24.
51. Crespo Y, Alonso A, Rosario LA, Arencibia DF. Potencial radioprotector y antigenotóxico *in vitro* del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. La Habana: IFAL-U.H;2012.p.1-54.
52. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med 2008;31(5):502-11.
53. Crusio WE, Schwegler H, Van Abeelen JH. Behavioral and neuroanatomical divergence between two sublines of C57BL/6J inbred mice. Behav Brain Res 1991;42:93-7.
54. Curbelo A, Rivero Y, Remigio A, Pérez G, Fernández N, Mancebo A, *et al.* *In vivo* genotoxic evaluation of Biological and Organic Pesticides and Fertilizers. Science International 2013;1(4):98-102.
55. Curbelo A, Rivero Y, Somoza N, Arteaga ME, Mantilla N. Efectos de la Ciclofosfamida en la morfología del espermatozoide de ratón. Retel 2011;34(2):14-24.
56. Curveco DL, Rosario LA, Narciandi J, Crespo J, Alonso A, Vidal A, *et al.* Assessment of epididymal sperm quality during 60 days oral administration of oil *Carapa guianensis* Aublet extract in male SD rats. Retel 2014; 44, *in press*.
57. Di Giorgio C, Benchabane Y, Boyer G, Piccerelle P, De Méo M. Evaluation of the

- mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. *Food Chem Toxicol* 2011;49:2773-9.
58. Diab KA, Aboul-Ela EI. *In vivo* Comparative Studies on Antigenotoxicity of Date Palm (Phoenix Dactylifera L.) Pits Extract Against DNA Damage Induced by N-Nitroso-N-methylurea in Mice. *Toxicol Int* 2012;19(3):279-86.
59. 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):75-6.
60. Doak SH, Jenkins GJ, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM. Mechanistic influences formulation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Research* 2007;15:3904-11.
61. Domínguez A, Tamayo M, Pérez I, Salas H, Pérez O, Batista A. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFO1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor* 2009;18(3):13-7.
62. Donato MT. Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? En: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Artículo 1; Granada: Real Academia Nacional de Farmacia;2006.p.29-62.*
63. Dricu A. Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. Rijeka: Intech Edition;2012.p.289-301.
64. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 2003;18(2):159-66.
65. EPA. Pesticides and Toxic Substances (7101), Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. United States Government Printing Office Editions. Washington: IRL Press;1998.p.3-4.
66. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2010;26(1):43-9.
67. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai E, *et al.* Nutrigenetics and Nutrigenomics: Viewpoints on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4(2):69-89.
68. Fernández SI, Rendón A, Noa M, Más R, Laguna A. Study of policosanol effects on mice

- germ cells. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 2006;37(1):3-7.
69. Fernández SI, Gámez R, Gutiérrez A, García H. Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 2005;36(Especial):1-6.
70. Ferrari M, Oliveira M, Nakano A, Rocha-Filho P. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). Rev Bras Farmacogn 2007;17(4):626-30.
71. Fielder RJ, Allen JA, Boobis AR, Botham PA, Doe J, Esdaile DJ. Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in “*In Vivo*” Mutagenicity Assays. Genetic Toxicol Environ Mutagen 1999;4:313-9.
72. Foijer F, Te Riele H. Restriction beyond the restriction point: mitogen requirement for G2 passage. Cell Division 2006;1(1):1-8.
73. Fraga JR, Domínguez Y, Friman M, González SB, Somoza AD, Pérez C. Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirosica vax-SPIRAL® empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. Anuario Toxicología 2001;1(1):35-9.
74. Gámez R, Fernández I, Acosta PC, 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):211-6.
75. Gámez R, Gutiérrez A, Más R, Arencibia DF, Curveco D, García H. *In vitro* Genotoxic Potential of D-002 on the Blood Lymphocytes Chromosomal Aberration Test. Lat Am J Pharm 2010;29(3):1-4.
76. Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García Ha, Bucarano I. *In vitro* Genotoxic Potential of D-003 on the Blood Lymphocytes Chromosomal Aberration Test. Retel 2012;38(4):51-63.
77. Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 2007;38(3):204-8.
78. Garner CE, Sumner SC, Davis JG, Burgess JP, Yueh Y, Demeter J, *et al.* Metabolism and disposition of 1-bromopropane in rats and mice following inhalation or intravenous administration. Toxicol Appl Pharmacol 2006;215:23-36.
79. Gerasimova T, Topashka-Ancheva M. Comparative data of the chromosome fragility in five wild small mammal species. Biotechnol & Biotechnol 2009; Especial Edition:396-9.

80. Gentilea J, Gentilea G, Lohmanb P, Fergusonc L. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. *Mutat Res* 2001;480:1-7.
81. Gilden RC, Huffling K, Sattler B. Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2010;39(1):103-10.
82. Giri S, Prasad SB, Giri A, Sharma GD. Genotoxic effects of Malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. *Mutat Res* 2002;514:223-31.
83. Gocke E, Burgin H, Muller L. Literature Review on the Genotoxicity, Reproductive Toxicity, and Carcinogenicity of Ethyl Methanesulfonate. *Toxicol Lett* 2009;190:254-65.
84. Gomes MR, De-Oliveira AC, De-Carvalho RR, Araujo IB, Souza CA, Kuriyama SN. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by ionone. *Toxicol Letter* 2003;138:205-13.
85. Gonçalves JF, Silva CE, Guimarães DG. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. *Pesq Agropec Brás* 2009;44(1):8-14.
86. Gonzales GF, Gasco M, Cordova A, Chungkin A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian Journal Andrology* 2001;3:231-3.
87. Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. *Asian Journal Andrology* 2003;5:349-52.
88. González J, Gámez R, Rodeiro I. Evaluation of genotoxic effect of D-003 in SD rats using the electrophoresis alkaline in individual cells (Comet assay). *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 2002;33:25-9.
89. Gowder S. Cell Interaction. Rijeka: Intech Edition;2012.p.1-322.
90. Griffiths AJ, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Genética*. 9^{na} edición. Madrid: Ediciones McGraw-Hill Interamericana;2008.p.25-49.
91. Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Arencibia DF, Goicochea E. Evaluación mutagénica *in vivo* del D-004. *Rev Cub Toxicol* 2012;1(2):1-7.
92. Gutiérrez A, Gámez R, Arencibia DF, Pardo B, García H. Evaluación del potencial

- genotóxico del D-004, para inducir aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 2010;41(Especial):1-7.
93. Guyton H, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. Barcelona: Editorial Elsevier Doyma S.L.;2011.p.1-450.
94. Hartman A, Herkommer K, Glück M, Speit G. DNA-Damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). Environ Mol Mutagen 1995;25:180-7.
95. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler S, Burlinson B. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis 2003;18(1):45-51.
96. Hayashi M, Tice R, MacGregor J.T, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M, *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat Res 1994;312(3):293-304.
97. Hayashi M, Dearfield K, Kasper P, Lovell D, Martus HJ, Thybaud V. Compilation and use of genetic toxicity historical control data. Mutat Res 2011;723(2):87-90.
98. Hernández T, Rosario LA. Evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo de dominantes letales, un artículo técnico. Retel 2010;27(2):9-18.
99. Hobbs CA, Recio L, Sheoard K, Baldetti C, Winters J, Green A, *et al.* Enhanced susceptibility to genotoxic damage in Wistar Han rats compared to Fischer 344/N rats. Environ Mol Mutagen 2009;50:584-8.
100. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. Nat Rev Genet 2010;11:855-66.
101. ICH. Harmonised tripartite guideline detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility S5(R2). Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA. Geneva: ICH;2005.p.1-21.
102. Jana NR, Sarkar S, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H. Strain differences in cytochrome P451A1 gene expression caused by 2,3,7,8- tetrachlorordibenzo-p-dioxin in the rat liver: Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. Biochem Biophys Res Commun 1998;248:554-8.
103. Jia C. The applications, Developments and Expectations of Micronucleus Test in China. Hereditas 2003;25(1):73-6.

104. Johnson DL, Ambrose SH, Bassett TJ, Bowen ML, Crummey DE, Isaacson JS, *et al.* Meanings of environmental terms. *J Environ Quality* 1997;26:581-9.
105. Kempinas WG, Lamano-Carvalho TL. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Lab Animals*. 1988;22:154-6.
106. Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Muller L. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res* 2005;584:1-256.
107. Kissling GE, Dertinger SD, Hayashi M, MacGregor JT. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutat Res* 2007;634:235-40.
108. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Conceptos de Genética*. 8^{va} edición. Madrid: Ediciones Pearson Prentice Hall;2006.p.213-39.
109. Kramer PJ. Genetic toxicology. The *in vitro* and *in vivo* aberration test. *J Pharm Pharmacol*. 2000;4:395-405.
110. Krishna G, Hayashi M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mut Research* 2000; 455(1-2):155-66.
111. Krishna G, Urda D, Paulissen J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mut Research* 2000; 453(1):45-50.
112. Krzanowska H. Sperm head abnormalities in relation to the age and strains of mice. *Journals of Reproduction and Fertility* 1981; 62:385-92.
113. Krzanowska H. Types of sperm head abnormalities in four inbred strains of mice. *Acta boil cracov (Ser Zool)* 1976;19:79-85.
114. Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathol Biol* 2004;52:314-22.
115. Lamadrid AI, Romero I, González JE, Mandina T. Biomonitoring of workers exposed to pesticides. *Rev Cub Inve Biom* 2011;30(2):235-44.
116. Lambert IB, Singer TM, Boucher SE, Douglas GR. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res* 2005;590:1-280.
117. Laxminarayana B, Vijay P, Yeshwanth R. Reproductive toxicity of sodium valproate in male

- rats. Indian Journal of Pharmacology 2010 ;42(2) :90-4.
- 118.Lazarow PB. Rat Liver peroxisomes catalyse the beta-oxidation of fatty acids. J Biol Chem 1978;253:1522-8.
- 119.LeBaron MJ, Schisler MR, Torous DK, Dertinger SD, Gollapudi BB. Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. Environ Mol Mutagen 2013;54(3):222-8.
- 120.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.
- 121.Legator MS, Palmer KA, Green S, Peterson KW. Cytogenetic studies in rats of cyclohexalamine, a metabolite of cyclamate. Science 1969;165:1139-40.
- 122.Lewin B. Genes IX. New York: McGraw-Hill/Interamericana Edition;2008.p.67-92.
- 123.Leyva O, Alonso A, Díaz A, Rosario LA, Carro S, Rodeiro I, *et al.* Genotoxic evaluation *in vitro* of *Erythroxyllum minutifolium*, an endemic Cuban plant. Retel 2010a;26(4):49-62.
- 124.Leyva O, Alonso A, Rosario LA, Díaz A, Prado Y, Rodeiro I, *et al.* Evaluación antigenotóxica del extracto etanólico de *Erythroxyllum minutifolium* grises utilizando el ensayo SOS. Retel 2010;26(3):36-48.
- 125.Lillford L, Beevers C, Bowen D, Kirkland D. Letter to the Re: DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. Mutagenesis 2010;25:427-8.
- 126.Limón MD, Aguilar A, Aragón MP, Argemí C, Cañedo D, Carbonell M, *et al.* Límite de exposición profesional para agentes químicos en España 2013. INSHT. Madrid: Ediciones del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo;2013.p.1-201.
- 127.Liu F, Ichihara S, Mohideen SS, Sai U, Kitoh J, Ichihara G. Comparative Study on Susceptibility to 1-Bromopropane in Three Mice Strains. Toxicol Sci 2009; 112(1):100-10.
- 128.Liu X, Gershenfeld HK. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. Biol Psychiatry 2001;49:575-81.
- 129.Lóriga E, Alfonso B, Socorro M, Ortega J, Pomares Y. Evaluación genotóxica de la vacuna VA-MENGOC-BC® empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Anuario Toxicología 2001;1(1):25-9.
- 130.Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug

- resistance, and the feature. In: Hoffman R, *et al* eds. Hematology: basic principles and practice. 2 ed. New York: Churchill Livingstone;1995.p.915-40.
- 131.Marrero G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Curveco D. Assessment of genotoxic effects of D-004 in NMRI mice using the alkaline single cell electrophoresis in gel (Comet Assay). *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 2007;38(3):200-3.
- 132.Marshall MV, Draney D, Sevick-Muraca EM, Olive DM. Single-Dose Intravenous Toxicity Study of IRDye800CW in Sprague-Dawley Rats. *Mol Imaging Biol.* 2010. DOI: 10.1007/s11307-010-0317x
- 133.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. *Toxicology Mechanisms Method* 2007;17(3):147-52.
- 134.Mazumdar M, Giri S, Giri A. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutat Res* 2011;721:147-52.
- 135.Miller GT. Sustaining the Earth, 6th edition. Chapter 9. California: Thompson Learning, Inc. Pacific Grove;2004.p.211-6.
- 136.Mishra R. Mutagenesis. Rijeka: Intech Edition;2012.p.1-246.
- 137.Mohammad A, Yearul K, Faizule H, Zaved W, Ehsanul M, Shafiqur R. Increased DNA damage in blood cells of rat treated with lead as assessed by comet assay. *Bangladesh J Pharmacol* 2008;3(2):97-101.
- 138.Mohammed B, Karim J, Yaseen Y. Anti mutagenic effects of *Thymus syriacus* extract against the genotoxicity of gemcitabine in male albino mice. *J Duhok Univ* 2009;12(Special Issue 1):216-26.
- 139.Moreno D, Rosario LA. Evaluation of Sprague Dawley rat as biomodel in two antigenotoxicity assays. *VacciMonitor* 2010;19(Suplement 2):246.
- 140.Mori A. The difference in sperm morphology in different strains of mice. *Tohoku J Agric Res* 1961;12:107-18.
- 141.Mosley C, Wang N, Gilley L, Wang S, Yu H. Light-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity of a Sunscreen Agent, 2-Phenylbenzimidazol in *Salmonella typhimurium* TA 102 and HaCaT Keratinocytes. *Intern J Env Res Pub Health* 2007;4(2):126-31.
- 142.Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Vainio H. Cytochrome P 450-

- related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1079-85.
143. Narciandi J, Rosario LA, Curveco DL, Vidal A, Arencibia DF. Evaluación del potencial mutagénico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de Ames por incorporación directa en placas. *Retel* 2013;40(4):45-58.
144. Narumi K, Takasawa H, Ohyama W, Kaneko K. *In vivo* comet assay of a novel galacto-oligosaccharide in rats. *Hum Exp Toxicol* 2014;33(5):488-95.
145. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *Journal of Cell Science* 2007;120(11):1833-40.
146. Obidike I, Maduabuchi I, Olumuyiwa S. Testicular morphology and cauda epididymal sperm reserves of male rats exposed to Nigerian Qua Iboe Brent crude oil. *Journal of Veterinary Sciences* 2007;8(1):1-5.
147. OECD (Organization for the Economy, Cooperation and Development). 2009. Genetic Toxicology: (Annual Report 2009). Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions. <http://www.oecd.org/bookshop> (accesado en junio 24, 2010).
148. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In: Guideline for the testing of chemicals. TG 474. Paris: OECD Publishing;1997.p.1-10.
149. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells. Anexo B11. In: OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OECD TG 475. Paris: OECD Publishing;1997a.p.23-32.
150. Ohta H, Sakaide Y, Wakayama T. Age- and substrain-dependent sperm abnormalities in BALB/c mice and functional assessment of abnormal sperm by ICSI. *Hum Reprod* 2009;24(4):775-81.
151. Oyarzabal MI. Líneas de ratones originales como modelos experimentales en genética y mejoramiento animal. *J Basic Appl Genet* 2011;22(1):7-12.
152. Park D, Jeon JH, Shin S, Joo SS, Kang DH, Moon SH, *et al.* Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450

- mRNA. *Reprod Toxicol* 2009;27:79-84.
153. Paz C, Bustamante G, Sánchez M, Leone P. Cytogenetic monitoring in a population occupationally and animals exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect* 2002;110:1077-80.
154. Penido C, Costa KA, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, Henriques MG. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF κ B activation. *International Immunopharmacology* 2006;6:109-21.
155. Pfuhrer S, Kirkland D, Kasper P, Hayashi M, Vanparys P, Carmichael P, *et al.* Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: identification and implementation opportunities report from an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 2009;680:31-42.
156. Phillips DM, Dryden GL. Comparative Morphology of Mammalian Gametes. In: A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Dunbar BS, O-Rand M editors. Pennsylvania: Plenum Press-Springer;1991.p.37-50.
157. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural Despair" in rats and mice: strain difference and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 1978;51:291-4.
158. Porter A, Singh G. Transplacental teratogenesis and mutagenesis in Mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Terat, Carc, and Mutag* 1998;8:191-203.
159. Povirk LF, Austin MJ. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 1991; 257:127-43.
160. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 1999;189:1571-5.
161. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monografía Medicina Veterinaria 1999;19(1-2):45-65.
162. Qi S, Wu D, Zhang S, Luo X. Constituent of *Carapa guianensis* Aubl (Meliaceae). *Pharmazie* 2004;59:488-90.
163. Quinones L, Rosero M, Roco A, Moreno I, Sasso J, Varela N. Role of Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolism of Antineoplastic Drugs. *Rev Med Chile* 2008;136:1327-35.
164. Raga D, Pocsidio G, Herrera A. Effects of the oral administration of nonpolar extract from *Ardisia squamulosa* Presl (*Myrsinaceae*) leaves on spermatogenesis in rats. *Pharmacognosy Res* 2011;3(4):260-5.

165. Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol. *J Toxicol Sci* 2010;35:149-62.
166. Recio R, Ocampo G, Borja VH, Moran J, Cebrian ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *Journal Applied Toxicology* 2008;28(5):674-80.
167. Reddy G, Song J, Kirby P, Johnson M. Genotoxicity assessment of ethylenediamine dinitrate (EDDN) and diethylenetriamine trinitrate (DETN). *Mutat Res* 2011;726:169-74.
168. Remigio AC, Pérez G, Fernández N, Bada AM, Arteaga ME, Mancebo A. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Rev Tox* 2001;18:75-8.
169. Repetto M, Repetto G. *Toxicología Fundamental*. Cuarta edición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos;2009.p.1-503.
170. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei H, Rezvanfar MC, Mohammadirad A. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human & Exp Toxicol* 2008;27: 901-10.
171. Ripoll N, Denis J, Dailly E, Hascoët M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research* 2003;143:193-200.
172. Rivero Y, Curbelo A, Pérez G, Fernández N, Scull I, Remigio A, *et al.* Evaluación Mutagénica de las tabletas orales de PV-2 con ensayos *in vivo*. *Retel* 2012;37(4):47-59.
173. Rodeiro I, Cancino L, González JE, Morffi J. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food Chem Toxicol* 2006;44(10):1707-13.
174. Rodríguez M, Téllez N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clín* 2004;56(1):56-71.
175. Roldan MD. De los cultivos al cerebro: el efecto de los pesticidas. *Mente y Cerebro* 2008; 33:50-1.
176. Rosario LA, Rodeiro I, Almeida E, Leyva O, Alonso A, Rodríguez Y, *et al.* Evaluation of the radioprotector effect of the aqueous extract of *Mangifera indica* L (Vimang), in SOS-

- Chromotest assays. *Retel* 2009;19(4):53-66.
- 177.Ryabchenko NM, Rodionova NK, Sychevska IS, Musalev II, Mikhailenko VM, Druzhyna MO. Genotoxic effects of radiation and hyperthermia in linear mice with different radiation sensitivity. *Cytology and Genetics* 2013;47(1):50-5.
- 178.Sanhueza J, Valenzuela A. Nutrigenómica: Revelando los aspectos moleculares de una nutrición personalizada. *Rev Chil Nutr* 2012;39(1):71-85.
- 179.Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31:9-15.
- 180.Shayne C.G. The Mouse. Toxicology. In: *Animal Models in toxicology*. Second Edition. New York: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC;2007.p.24-72.
- 181.Shetty AJ. The effect of gabapentin and phenytoin on sperm morphology in Wistar rats. *Reproductive Biology* 2007;73:247-51.
- 182.Silbergeld EK. Capítulo 33 “Toxicología”. En: *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo de la OIT*. Traducción en Español para América Latina y el Caribe. Cuarta Edición. Series Bibliografías Temáticas Digitales. Ginebra: Ediciones OIT;2012.p.1-71.
- 183.Singh SS. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Curr Drug Metab* 2006;7(2):165-82.
- 184.Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O’Donovan MR. Recommendations for design of the rat Comet assay. *Mutagenesis* 2008;23:233-40.
- 185.Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mut Res* 2009;681(1):3-12.
- 186.Stuart D. *The Mechanisms of DNA Replication*. Rijeka: Intech Edition;2013.p.1-485.
- 187.Sudhir K, Sankar S. Mutation rates in mammalian genomes. *Proceed Nat Acad Sci Unit Stat Ame* 2002;99:803-8.
- 188.Teitelbaum DT. Introducción a la toxicología ocupacional y ambiental. En: *Farmacología básica y clínica*. Katzung B Masters S, Trevor A. Lange Medical Book (11na edición). México: McGraw-Hill-Lange Edición;2009.p.987-98.
- 189.Tetko IV, Bruneau P, Mewes HW, Rohrer DC, Poda GI. Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions? *Drug Discov Today* 2006;11(15-16):700-7.
- 190.Thirumulu K, Ikehara K. *Advances in the Study of Genetic Disorders*. Rijeka: Intech Edition;2011.p.1-472.

191. Thybauda V, MacGregor J, Müller L, Crebelli R, Dearfield K, Douglas G, *et al.* Strategies in case of positive *in vivo* results in genotoxicity testing. *Mutat Res* 2011;723(2):121-8.
192. 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(3):305-12.
193. Tirunilai P. Recent Trends in Cytogenetic Studies - Methodologies and Applications. Rijeka: Intech Edition;2012.p.1-146.
194. Tonini H, Arco M. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. *Pesq Agropec Brás* 2005;40(7):633-8.
195. Tornaletti S, Pfeiffer GP. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 1996;18:221-8.
196. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res* 2010;696(1):69-80.
197. Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Evaluation of male germ cell toxicity in rats: correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutat Res* 2010;703(2):115-21.
198. Troyer L. Variable Fitness Impact of HIV-1 Escape Mutations to Cytotoxic T lymphocyte (CTL) Response. *Plos Pathogens* 2009;5(4):e1000365.
199. UE. Unión Europea. Recomendación de la comisión de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos L197/. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2007;1:25-36.
200. Vasquez MZ. Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* 2010;25:187-99.
201. Vicens P, Bernal MC, Carrasco MC, Redolat R. Previous Training in the Water Maze: Differential Effects in NMRI and C57BL Mice. *Physiology & Behavior* 1999;67(2):197-203.
202. Vidal A, Arencibia DF, Rosario LA. Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay. *VacciMonitor* 2010;19(Suplement 2):243.

203. Wakui S, Takagi F, Muto T, Yokoo K, Hirono S, Kobayashi Y, *et al.* Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. *Toxicology* 2007;238(2-3):186-91.
204. Weisburger J. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutat Res* 2001;480:23-5.
205. WPR. Working Party Report. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. European Commission No L358, ISSN 0378-6978). *Lab Anim* 1997;31:1-32.
206. Wu H, Guo H, Zhao R. Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi* 2006;126(5):365-71.
207. Wyrobek A, Bruce W. Induction of sperm abnormalities in mice. *National Academy of Sciences* 1975;72:4425-8.
208. Wyrobek AJ, Bruce WR. The induction of sperm-shape abnormalities in mice and humans. Volume 5. In: *Chemical Mutagens*. A. Hollander and F.J. de Serres (Eds.). New York: Plenum Press;1978.p.257-85.
209. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp RW, Letz G, *et al.* An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in non-human mammals. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-toxicology program. *Mutation Research* 1983;115:1-72.
210. Xacur-García F, Castillo-Quan J, Hernández-Escalante V, Laviada-Molina H. Genómica nutricional: una aproximación de la interacción genoma-ambiente. *Rev Méd Chil* 2008;136:1460-7.
211. Xiaoqing L, Howard K. Genetic Differences in the Tail-Suspension Test and Its Relationship to Imipramine Response among 11 Inbred Strains of Mice. *Biol Psychiatry* 2001;49:575-81.
212. Yiqiang L, Mengmeng Q, Liwei S, Yulin W, Yuangao Ch, Haigang Ch, *et al.* Genotoxicity study of phenol and o-cresol using the micronucleus test and the comet assay. *Toxic Environ Chem* 2005;87(3):365-72.
213. Yu LJ, Drewers P, Gustafsson K, Brain EG, Hecht JE, Waxman DJ. *In vivo* modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:928-37.
214. Yucra S, Gasco M, Rubio JF, Gonzáles G. Exposición ocupacional a plomo y pesticidas

organofosforados: Efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Revista Peruana Medicina Experimental Salud Pública* 2008;25(4):394-402.

215. Zúñiga G, Torres O, Zamora A, Gymez BC, Ramos ML, Martinez S, *et al.* Differences in Number of Micronucleated Erythrocytes among Young and Adult Animals Including Humans. *Spontaneous Micronuclei in 43 Species. Mutat Res* 2001;494:161-7.

216. Zúñiga G, Torres O, Ramirez MP, Ramos A, Fanti E, Portilla E, *et al.* Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res* 1996;369:123-7.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo # 1.



AMAZON ANDIROBA OIL

2 ounces: \$23.00

4 ounces: \$32.00

8 ounces: \$42.00

Andiroba Oil is an emollient nut oil which has been processed from the seeds or nuts of the Amazonian tree, *Carapa guianensis*. The Indians in the Amazon have used andiroba oil for centuries as a natural insect repellent.* Chemical analysis of andiroba oil has identified the presence of a group of chemicals called limonoids. The anti-inflammatory and insect repellent properties of andiroba oil are attributed to the presence of these limonoids, including a novel one which has been named andirobin.* For more complete information on this unique rainforest nut oil, please see the Raintree Nutrition internet website and the online [Tropical Plant Database](#).

Traditional Uses:* for insect bites and stings; as an insect repellent; for psoriasis, dermatitis, heat rash, skin fungi, and other skin problems; for skin parasites; for skin cancer

Ingredients: 100% all natural andiroba oil (*Carapa guianensis*). No preservatives, additives or other chemicals are added.

Suggested Use: Apply to skin as desired, and/or take 60 drops (2 ml) internally twice daily.

Contraindications: Do not take internally while pregnant or while breast-feeding.

Drug Interactions: None reported.

Other Observations: None reported.

Clinical Documentation and Research:* This Raintree product has not been the subject of any clinical research. Available third-party research on andiroba can be found at the Raintree website or on [Pubmed](#). A partial listing of published research on andiroba is shown below:

Insect Repellent & Insecticidal Actions:

Roy, A., et al. "Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom." *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29(2): 191-201.

de Mendonca, F. A., et al. "Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*." *Fitoterapia*. 2005 Dec; 76(7-8): 629-36.

Silva, O. S., et al. "The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*." *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2004 Dec; 20(4): 456-7.

Miot, H. A., et al. "Comparative study of the topical effectiveness of the Andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp." *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2004 Sep-Oct; 46(5): 253-6.

Konan, Y. L., et al. "Comparison of the effect of two excipients (karite nut butter and vaseline) on the efficacy of *Cocos nucifera*, *Eleais guineensis* and *Carapa procera* oil-based repellents formulations against mosquitoes biting in Ivory Coast." *Parasite*. 2003 Jun; 10(2): 181-4.

Sylla, M., et al. "Evaluation of the efficacy of coconut (*Cocos nucifera*), palm nut (*Eleais guineensis*) and gobi (*Carapa procera*) lotions and creams in individual protection against *Simulium damnosum* S.L. bites in Cote d'Ivoire." *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2003 May; 96(2): 104-9.

Gilbert, B., et al. "Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants." *An. Acad. Bras. Cienc.* 1999; 71(2): 265-71.

Mikolajczak, K. L., et al. "A limonoid antifeedant from seed of *Carapa procera*." *J. Nat. Prod.* 1988; 51(3): 606-10

Wound Healing Actions:

Nayak, B., et al. "Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. Leaf for its wound healing activity using three wound models." *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2009 Oct 13.

Hammer, M. L., et al. "Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil)." *J. Ethnopharmacol.* 1993 Sep; 40(1): 53-75.

Antiparasitic & Antiprotozoal Actions:

Mesquita, M. L., et al. "Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005 Nov; 100(7): 783-7.

MacKinnon, S., et al. "Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives." *J. Nat. Prod.* 1997; 60(4): 336-41.

Titanji, J. P., et al. "Novel *Onchocerca volvulus* filaricides from *Carapa procera*, *Polyathia suaveolens* and *Pachypodanthium staudtii*." *Acta. Leiden.* 1990; 59: (1-2) 377-82.

Anti-Allergic Actions:

Penido, C., et al. "Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFkappaB activation." *Int. Immunopharmacol.* 2006; 6(2): 109-21.

Penido, C., et al. "Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia." *Inflamm. Res.* 2005; 54(7): 295-303.

Anti-Inflammatory & Pain-Relieving Actions:

Penido, C., et al. "Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice." *Inflamm. Res.* 2006; 55(11): 457-64.

Penido, C., et al. "Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia." *Inflamm. Res.* 2005; 54(7): 295-303.

Hammer, M. L., et al. "Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil)." *J. Ethnopharmacol.* 1993 Sep; 40(1): 53-75.

Cytotoxic and Anticancerous Actions:

Moura, M. D., et al. "Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia." *Acta. Farm. Bonaerense.* 2002; 21(1): 67-74.

Cohen, E., et al. "Cytotoxicity of nobile, epoxyazadiradione and other liminoids from neem insecticide." *Life Sci.* 1996; 58(13): 1075-81.

Hammer, M. L., et al. "Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil)." *J. Ethnopharmacol.* 1993 Sep; 40(1): 53-75.

Nakanishi, K., et al. "Phytochemical survey of Malaysian plants." *Chem. Pharm. Bull.* 1965; 13(7): 882-890.

Antibacterial Actions:

Nakanishi, K., et al. "Phytochemical survey of Malaysian plants." *Chem. Pharm. Bull.* 1965; 13(7): 882-890.

Toxicity Studies (Non-toxic effects):

Costa-Silva, J., et al. "Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil." *J. Ethnopharmacol.* 2008 Mar 28; 116(3): 495-500.

Costa-Silva, J., et al. "A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats." *J. Ethnopharmacol.* 2007 May 30; 112(1): 122-6.

Chemical Constituents Identified:

da Silva, V., et al. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography." *Phytochem. Anal.* 2009 Jan; 20(1): 77-81.

Tappin, M., et al. "Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008 Dec 1; 48(4): 1090-5.

This Raintree product is a professional product sold through health practitioners and [Raintree Nutrition](#). It is not available in retail stores. Please contact a health professional concerning other observations and/or effects of this product and/or if you have any disease, condition, or illness for which you are seeking treatment or products for.

Manufactured By:
Raintree Nutrition, Inc.
3579 Hwy 50 East, Suite 222
Carson City, NV 89701
(800) 780-5902 (775) 841-4142
www.RaintreeNutrition.com



* The statements contained herein have not been evaluated by the Food and Drug Administration. This product is not intended to treat, cure, or prevent any disease.

Anexo # 2.

Presence of Compounds in Andiroba (*Carapa guianensis*)

Compound	Chemical type	Plant Part	Plant Origin	Quantity	Ref #
Andirobin	Alkaloid	Seed	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Arachidic acid	Lipid	Seed	Not Stated	1.2%	BR1003
Azadiradione, 6-alpha-acetoxy-epoxy	Triterpene	Plant	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Azadiradione, epoxy	Triterpene	Plant	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Fat	Lipid	Seed	Not Stated	550,000-650,000 ppm	ZZ1022
Gedunin	Triterpene	Not Stated	Trinidad	Not Stated	N02487
Gedunin, 6-alpha-11-beta-diacetoxy	Triterpene	Heartwood Not Stated	West Indies Trinidad	Not Stated Not Stated	J08008 N02487
Gedunin, 6-alpha-acetoxy	Triterpene	Not Stated Heartwood	Trinidad West Indies	Not Stated Not Stated	N02487 J08008
Gedunin, 6-alpha-hydroxy	Triterpene	Plant	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Gedunin, 6-beta-acetoxy	Triterpene	Seed	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Gedunin, 6-beta, 11-beta-diacetoxy	Triterpene	Bark	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Gedunin, 7-deacetoxy-7-oxo	Triterpene	Plant	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Gedunin, 7-deacetoxy: 6-alpha-11-beta-dihydroxy	Triterpene	Not Stated	Trinidad	Not Stated	N02487
Gedunin, 7-deacetoxy: 6-alpha-7-alpha-11-beta-trihydroxy	Triterpene	Not Stated	Trinidad	Not Stated	N02487
Gedunin, 7-desacetoxy-7-keto	Triterpene	Seed	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Gedunin, 7-deacetoxy: 7-alpha-hydroxy	Triterpene	Not Stated	Trinidad	Not Stated	N02487
Gedunin, 11-beta-acetoxy	Triterpene	Bark	Not Stated	Not Stated	ZZ1022
Hexadecenoic acid	Lipid	Seed	Not Stated	1%	BR1004

© Copyrighted 2004. Raintree Nutrition, Inc. Carson City, NV 89701. All Rights Reserved. www.rain-tree.com

Compound	Chemical type	Plant Part	Plant Origin	Quantity	Ref #
Linoleic acid	Lipid	Seed	Not Stated	9%	BR1003
Linolenic acid	Lipid	Seed	Not Stated	0.3%	BR1003
Oleic acid	Lipid	Seed	Not Stated	275,000-375,000 ppm	ZZ1022
Palmitic acid	Lipid	Seed	Not Stated	55,000-65,000 ppm	ZZ1022
Palmitoleic acid	Lipid	Seed	Not Stated	1%	BR1003
Stearic acid	Lipid	Seed	Not Stated	220,000-260,000 ppm	ZZ1022

PHYTOCHEMICAL SCREENING

ALKALOIDS PRESENT SEED A01890
 BARK L16047

Return to the [Andiroba Plant Database File](#)

© Copyrighted 2004 Raintree Nutrition, Inc. Carson City, Nevada 89701. All rights reserved.
 Please read the [Conditions of Use](#) and [Copyright Statement](#) for this web file and website.

© Copyrighted 2004. Raintree Nutrition, Inc. Carson City, NV 89701. All Rights Reserved. www.rain-tree.com

AVALES DE LA TESIS

1. Producción científica del aspirante relacionada directamente con el tema de tesis

1.1 Revistas

1. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. THEORIA 2009; 18(2):7-13.
2. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Hernández Y. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6. Revista Cubana de Farmacia. 2010; 44(4):503-511.
3. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Cometa. ARS Pharmaceutica 2010; 51(1):49-56.
4. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Revista Veterinaria Argentina 2010; 27(264):1-13.
5. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Curveco D. Comparación de la respuesta de ratones Balb/c de ambos sexos a la administración de dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Revista Veterinaria Argentina 2010; 27(269):1-10.
6. **Arencibia D.F.**, Vidal A, Rosario L.A, Delgado L. Comparación de la respuesta de ratas Sprague Dawley frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. ARS Pharmaceutica 2010; 51(3):155-162.
7. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Rodríguez Y. Assessment of basal and induced DNA damage on lymphocytes from three mouse lines by means of the alkaline comet assay. Biotecnología Aplicada 2011; 28(2):101-105.
8. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E. Sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. Journal of Basic and Applied Genetics 2011; 22(2):24-32.

9. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E. Comparación entre líneas de ratones como biomodelos en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *Revista Internacional de Andrología* 2011; 9(3):103-108.
10. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos de ensayos de genotoxicidad. *Animales de Laboratorios* 2011; 51:21-32.
11. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Comparación de dos biomodelos (ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley) en el ensayo cometa alcalino. *Biocyt* 2011; 4(14):229-239.
12. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Química Viva* 2011; 10(2):106-117.
13. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Delgado L. Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *VacciMonitor* 2011; 20(3):21-26.
14. **Arencibia D.F.**, Vidal A, Rosario L.A, Suárez Y.E, Delgado L. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica. *Revista de Toxicología* 2011; 28(2):152-157.
15. **Arencibia D.F.**, Vidal A, Rosario L.A, Suárez Y.E, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor* 2011; 20(1):28-33.
16. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET* 2011; XII (2): 1-13.
17. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Assessment of Sprague Dawley rats as biomodel in two antigenotoxicity assays. *Veterinary World* 2011; 4(10):455-460.
18. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Review about assessment of different murine lines as biomodel in genotoxicity assays by means of cytogenetic methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 2011; 1(4):552-562.

19. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Vidal A. Comparación entre líneas de ratones en el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. Revista MVZ Córdoba 2012; 17(2):2957-2963.
20. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Vidal A. Comparación de la eficiencia de diferentes cepas de ratas a través del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. REDVET 2012; 13(10):1-11.
21. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A, Delgado L. Comparison in the efficiency of different murine lines for genotoxicity assays. Interdisciplinary Toxicology 2012; 5(3):141-149.
22. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Delgado L, Alonso A, Suárez Y.E, Vidal A. Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de micronúcleos en ratones Balb/c. Retel 2012; 39(1):1-13.
23. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Delgado L, Alonso A, Infante J.F, Vidal A. Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de aberraciones cromosómicas en ratones Balb/c. Revista Cubana de Farmacia 2013; 47(3):363-367.
24. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Delgado L, Alonso A, Vidal A. Potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide. Revista Internacional de Andrología 2013; 11(2): 54-59.
25. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Delgado L, Alonso A, Crespo Y, Biart O, Vidal A. *In vivo* genotoxic potential of the seed oleaginous extract of *Carapa guianensis* Aublet using the comet assay. Journal of Experimental and Integrative Medicine 2013; 3(3):231-236.
26. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Comparison of micronuclei frequency in bone marrow cells of three rat lines. Cytology and Genetics 2013; 47(2):118-123.

1.2 Libros

1. **Arencibia D.F.** Rosario L.A, Serrano D.A. Evaluación preclínica del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet como suplemento nutricional antioxidante. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española (EAE); 2013.p.1-61. ISBN: 978-3-659-08401-0.

2. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Suárez Y.E, Vidal A. Reporte de daños básicos e inducidos al ADN mediante ensayos genotóxicos de especies murinas comercializadas en Cuba. Saarbrücken, Alemania: Editorial PUBLICIA; 2014.p.1-90. ISBN: 978-3-639-55471-7.
3. **Arencibia D.F.**, Rosario L.A, Narciandi J. Evaluación del potencial mutagénico y genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española (EAE); 2014.p.1-61. ISBN: 978-3-8473-6521-1.

2. Eventos

1. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas mediante el ensayo cometa. V Taller Científico del Laboratorio Central de Farmacología 2010 (Facultad de Ciencias Médicas Dr. Salvador Allende) 10-14/05/10 (**Autor**).
2. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias. XVI Forum de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa, 2010 (VPI. Instituto Finlay) 2-3/06/10. (**Autor**). Trabajo Relevante propuesto al Forum de Ciencia y Técnica Municipal.
3. Spontaneous and induced frequency of anomalies in the head sperm morphology in NMRI mice, Aceptado y presentado para el XII International Congress of Toxicology, IUTOX, BARCELONA, ESPAÑA. 19-23/07/10. (**Autor**).
4. Obtención del Sello Forjadores del Futuro otorgado en enero del 2010. (**Autor**).
5. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias. XVI Forum Municipal de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa. 29/09/10. (**Autor**). Trabajo Relevante, propuesto al Forum de Ciencia y Técnica Provincial.
6. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas mediante el ensayo cometa. 1^{er} Encuentro Latinoamericano de la Ciencia de los Animales de Laboratorio. 3-6/11/10. (**Autor**).
7. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias. XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa (IPB, Finlay). 25/11/10. (**Autor**). Trabajo que obtuvo la categoría de Mención.

8. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones Balb/c. Forum Juvenil del Instituto Finlay 2010. 2/12/2010. (**Autor**).
9. Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay. Pharmacology Havana 2010. 13-16/12/10. (**Coautor**).
10. Evaluation of Sprague Dawley rat as biomodel in two antigenotoxicity assays. Pharmacology Havana 2010. 13-16/12/10. (**Coautor**).
11. The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. Pharmacology Havana 2010. 13-16/12/10. (**Autor**).
12. Ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas. VII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias 2011. 10-14/04/11. (**Coautor**).
13. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio dos años de experiencias. VII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias 2011. 10-14/04/11. (**Autor**).
14. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad. XI Jornada Científica del CENATOX 2011. 22-24/06/11. (**Autor**).
15. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad. XVI Forum de Ciencia y Técnica de Base del Instituto Finlay, 5ta. Etapa. 12-13/07/11. (**Autor**). Trabajo en la categoría de Destacado.
16. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelos en dos ensayos de antigenotoxicidad. III Taller Estudiantil de Farmacología y Terapéutica de la Sociedad Cubana de Farmacología (TESFAR'11). 28/09-1/10/11 (**Coautor-Tutor**).
17. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad. Congreso Internacional Agrociencias 2011, UNAH. 19-21/10/11. (**Autor**).
18. Biomodelos experimentales en estudios de seguridad de productos biotecnológicos. Congreso Internacional Agrociencias 2011, UNAH. 19-21/10/11. (**Autor**).
19. Experiencia profesional en el campo de la investigación toxicológica. Congreso Internacional Agrociencias 2011, UNAH. 19-21/10/11. (**Autor**).
20. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad. 1^{er} Simposio Internacional SCCAL. 16-18/11/11. (**Autor**).

21. Assessment and comparison of different mice breeds as experimental biomodel in genotoxicity assay. Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11/11. (**Autor**).
22. Alkaline comet assay of Sprague Dawley rat's epididymal sperms as oxidative stress marker. Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11/11. (**Coautor**).
23. La gota citoplasmática de espermatozoides de epidídimos como indicador de daño citotóxico ante estrés oxidativo y ambiente genotóxico. Seminario Científico Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis, MTC 2011. 15-16/12/11. (**Autor**).
24. Comparación entre líneas de ratones como biomodelos en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. Seminario Científico Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis, MTC 2011. 15-16/12/11. (**Coautor**).
25. La gota citoplasmática de espermatozoides como indicador de daño citotóxico ante estrés oxidativo y ambiente genotóxico. XII Jornada Científica del CENATOX. 20-22/06/12. (**Autor**). Trabajo en la categoría de Destacado.
26. Potencial genotóxico *in vivo* del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet administrado por vía oral. Simposio Internacional de Química SIQ 2013. 4-7/06/13. (**Autor**).
27. Assessment of antioxidant effect and non genotoxic of seed oleaginous extract *Carapa guianensis* aublet on *in vivo* and *in vitro* model. CubaRedox 2014. IV Conferencia Internacional de Estrés Oxidativo. 13-15/05/14. (**Autor**).

3. Distinciones científicas recibidas

1. Obtención del Sello Forjadores del Futuro otorgado en enero del 2010.
2. Trabajo Relevante en el XVI Forum de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa, 2010 (VPI. Instituto Finlay). El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias.
3. Trabajo Relevante Presentado en el XVI Forum Municipal de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa, 2010. Propuesto a Nivel Provincial. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias.
4. Trabajo de Mención Presentado en el XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica, 4ta. Etapa, 2010. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias.

5. Autor de un trabajo Destacado en el XVI Forum de Ciencia y Técnica de Base del Instituto Finlay, 5ta. Etapa, 2011. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en los ensayos de genotoxicidad.
6. Autor de un Trabajo Destacado presentado en la XII Jornada Científica del CENATOX. 20-22/06/12. La gota citoplasmática de espermatozoides como indicador de daño citotóxico ante estrés oxidativo y ambiente genotóxico.
7. Mejor tesis presentada en la carrera de Licenciatura en Farmacia, Fórum Estudiantil 2014. IFAL-U.H 21-22/05/14. Evaluación genotóxica y mutagénica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet.

4. Tutorías de tesis de pregrado

1. Dos tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos (2012).
 - Protección celular *in vitro* del suplemento nutricional de *Carapa guianensis* durante la terapia antineoplásica.
 - Evaluación preclínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante.
2. Una tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas (2014). Evaluación genotóxica y mutagénica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet.