

Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*e}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{**}, Yolanda Emilia Suárez Fernández^{***}, Alexis Vidal Novoa^{****}.

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

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

***Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

****Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, Cuba.

^eE-mail : darencibia@finlay.edu.cu

Recibido el 04/04/2011 - Aceptado el 03/05/2011

Resumen:

El ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas (AC) en médula ósea permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas. En este artículo tuvimos como objetivo realizar una comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y AC en células de la médula ósea, teniendo en cuenta la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida (CF). Se utilizaron diez animales/sexo/grupo/especie, las especies evaluadas fueron ratones BALB/c y ratas Sprague Dawley (SD). Estos fueron tratados durante 14 días. Se formaron cuatro grupos uno no fue inoculado, dos controles se inocularon con sustancias vehículo y un control positivo fue inoculado con CF 50 mg/kg por vía i.p. Pasado este tiempo se obtuvieron las células de la médula ósea y se procesaron para obtener micronúcleos y metafases analizables. En el ensayo de micronúcleos el biomodelo ideal fue el ratón BALB/c, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF. Por su parte en el ensayo AC el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentando un menor número de células con aberraciones, pero las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, induciendo mayor número de aberraciones cromosómicas. Este estudio permitirá utilizar el mejor biomodelo murino en ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad, aplicable a productos naturales, fármacos, vacunas, desinfectantes y otros.

Palabras clave: Ensayo de micronúcleos, ensayo de aberraciones cromosómicas, ADN, ratones BALB/c, ratas Sprague Dawley.

Comparison between two murine biomodels in the micronuclei and chromosomal aberration assay in bone marrow cell.

Abstract:

Micronuclei and chromosomal aberration assay in bone marrow cell allow registering *in vivo* the capacity of the chemical substances to induce chromosomal ruptures or to interfere the chromosomes metaphases migration during the mitosis of the somatic cells. The aim of this work was to compare between two murine biomodels in the micronuclei and chromosomal aberration (CA) assay in bone marrow cell reporting the basal and induced frequency indexes with cyclophosphamide. Ten animal/sex/group/species were used; the evaluated species were BALB/c mice and Sprague Dawley (SD) rats. These were administered during 14 days. Four groups were formed: a non administered group, two controls with vehicle and a positive control administered with CF 50 mg/kg by i.p way. Past this time the cells of the bone marrow were obtained and they were processed to obtain micronuclei and metaphases to be analyzed. In the micronuclei assay the ideal biomodel was the BALB/c mice, keeping in mind the lowest values in spontaneous micronuclei and the higher values induced. The results obtained indicated that BALB/c mice are more susceptible than the SD rats to the CF mutagen. On the other hand, in the CA assay the best experimental biomodel with lowest spontaneous indexes was the mice BALB/c, which experienced a smaller number of cells with aberrations, but the SD rats demonstrated to be more susceptible to the CF, inducing a great number of chromosomal aberrations. This study will allow to choose the best murine biomodel in these genotoxicity and antigenotoxicity assay, applicable to natural products, drugs, vaccine, disinfectant and others.

Keywords: Micronuclei assay, chromosomal aberration assay, DNA, BALB/c mice, Sprague Dawley rats.

Introducción

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre (1,2). 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. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante (3).

El ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas de médula ósea de roedores, son ensayos incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH), (4,5) ambos ensayos son fácilmente reproducibles y brindan información clara sobre la proliferación celular en médula ósea (5,6).

Estos sistemas permiten registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas (6).

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia basal de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética, para entonces de esta forma corroborar la existencia o no de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, además al ser estas pruebas tan decisivas en la evolución positiva o negativa de un nuevo producto de índoles diversas es necesario buscar el biomodelo animal ideal.

Por lo cual se hace necesario que estos biomodelos expresen la menor frecuencia de aparición de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células en constante formación como son las células de la médula ósea como parámetro medible del daño genotóxico. Esto permitirá detectar, con el mínimo margen de error, la actividad genotóxica de una sustancia química o agente complejo en el material genético. Al utilizarse en nuestros días diferentes especies indistintamente es necesario conocer el biomodelo ideal a partir de obtener resultados de índices espontáneos bajos e inducidos altos.

A partir de esta problemática surge la necesidad de realizar una comparación en cuanto a la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida (CF), de micronúcleos de eritrocitos de médula ósea y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea igualmente entre ratones BALB/c y ratas Sprague Dawley (SD) de ambos sexos. Para de esta forma identificar el mejor biomodelo murino experimentalmente, lo cual pudiera aplicarse en estudios de otros fármacos o agentes no explorados en relación al efecto genotóxico.

Destacando que utilizamos para este estudio solo ratones de la línea BALB/c sobre la base de los resultados de nuestras investigaciones donde obtuvimos que esta línea es la más eficiente en este ensayo. Tomando en consideración la baja frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea encontrada en ratones adultos de esta línea en ambos sexos; así como la alta sensibilidad a sustancias mutagénicas como la CF (7-9).

Materiales y Métodos

- Animales.

Se utilizaron ratas SD adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-200 g al término de la cuarentena. De igual forma se incluyeron ratones adultos jóvenes de ambos sexos de la línea BALB/c con una edad de 6-7 semanas, cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g. Ambas especies se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para cada especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (10).

- Administración y dosificación.

Grupos experimentales incluidos.

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 10 animales/sexo/especie. En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo. A estos animales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 14 días.

En el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2 %, siendo el vehículo más utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo; (11,12) en el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9 %, útil como disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar (13,14), ambas sustancias fueron administradas por vía oral a 2 ml/kg durante un periodo de 14 días, preparadas 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF, en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, (Ledoxina®, Lemri, S.A.), la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 % (15). La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales a las 48 horas y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita a razón de 10 ml/kg (16).

- Observaciones clínicas.

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

- Eutanasia.

Todos los animales fueron eutanizados bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de los reflejos, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 14 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, la eutanasia se realizó 24 horas después de la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día de la eutanasia en todos los casos (17).

- Exámenes realizados.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratas.

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 4 ml de suero bovino fetal (18). La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de

micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos (18-20). Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.

Ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo.

En el horario de la mañana (2 horas antes del sacrificio), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (6 mg/kg, vía i.p). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante (18,19). 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 minutos. 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. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones estructurales (rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos) y frecuencia de gaps (21,22). También se calculó el índice mitótico IM % (porcentaje de metafases en 1 000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles (21,22), todas las determinaciones fueron leídas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.

- Análisis estadístico.

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables continuas frecuencia de EP portadores de micronúcleos, índice de citotoxicidad (EP/EN) y el índice mitótico, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene) (17). Por lo cual se analizaron con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha = 0.05$. Las variables categóricas (número total de MN, número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN, número de células con aberraciones que incluye (de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos), frecuencia de gaps, así como el número de células con poliploidía), se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado, el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0.01$ (17). Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y Discusión

En este estudio no se observaron síntomas clínicos indicativos de toxicidad en ninguno de los grupos experimentales, siendo válido estos resultados para ambas especies. Demostrando que se logró inducir toxicidad a nivel de ADN pero no sistémico.

En la tabla 1 observamos 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 esta en el orden entre 0,85-0,87. Para el caso del índice de genotoxicidad se observa que el valor basal del % 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 genotoxicidad con CF este índice experimento un ascenso que difiere de forma significativa con los grupos controles, estando en el rango con valores desde 1,65-1,82%, induciendo la formación de un número total de MN que van desde 233-258. Los resultados encontrados en esta línea de ratón tanto basales como inducidos concuerdan con los encontrados por nuestro grupo de trabajo al evaluar la CF y la bleomicina, ambas drogas genotóxicas con diferentes diseños de tratamiento (15).

Tabla 1. Comparación de la frecuencia basal e inducida de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea entre ratas SD y ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupo	n	EP/EN ^d	MN-EP (%) ^d	MN ^D
Ratones BALB/c				
Machos				
Control negativo	10	1,18 ± 0,01a	0,16 ± 0,03a	23a
Sustancia vehículo 1	10	1,16 ± 0,04a	0,18 ± 0,04a	26a
Sustancia vehículo 2	10	1,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04a	25a
Control positivo (CF) ^a	10	0,87 ± 0,03*a	1,82 ± 0,89*a	258*a
Hembras				
Control negativo	10	1,15 ± 0,05a	0,13 ± 0,04a	19a
Sustancia vehículo 1	10	1,17 ± 0,02a	0,14 ± 0,07a	20a
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*a	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).^a Administración 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 (Difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística.

Por otro lado igualmente con los resultados observados en la tabla 1 al evaluar en este mismo ensayo ratas SD de ambos sexos, se corroboraron los índices espontáneos presentes en esta especie teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad encontrándose entre 1,18-1,21 y el índice de genotoxicidad observándose que se encuentran entre 0,15-0,22 (23). Para el caso de los resultados inducidos con la CF clastógeno químico, se corroboró que esta mutágeno es capaz de inducir citotoxicidad en esta especie de ratas con valores que van desde 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 (23).

Al comparar ambas especies en este ensayo encontramos que la línea de ratones BALB/c constituye el biomodelo ideal, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos encontrados y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF, estos resultados difirieron significativamente entre especies. Los ratones BALB/c también fueron la mejor línea de ratones al ser comparados con ratones NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp en este ensayo (7-9). Demostrando que mediante el mecanismo de formación endógena de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea los ratones BALB/c son mucho más estable genéticamente que las ratas SD, siendo un fuerte factor predominante en este estudio el hecho de que está línea de ratón es isogénica, obteniendo bajas tasas de variaciones genéticas y epigenéticas entre individuos.

En la tabla 2 se encuentran los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas. Para el caso de los ratones BALB/c los resultados básales del número de células con aberraciones se encuentran entre 7-10, resultado bastante bajo que concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo (16,22, 24). Igualmente fueron encontrados resultados bajos de células con poliploidía con valores entre 0-1. El índice mitótico basal fue bastante alto experimentando valores desde 4,98-5,98%. Además el número de metafases con aberraciones cromosómicas estructurales de tipo Gaps fue entre 2-6 (24).

Tabla 2. Resultados de la 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 ± 0,56a	1	4	7a
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,89 ± 0,24*a	14**a	47**a	175**a
Sustancia Vehículo 1	5,49 ± 0,53a	0	6	8a
Sustancia Vehículo 2	5,86 ± 0,20a	0a	7a	10a
Hembras				
Control Negativo	5,98 ± 0,22a	1	6	8a
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,93 ± 0,84*a	18**a	44**a	192**a
Sustancia Vehículo 1	4,98 ± 0,79	0a	5	8a
Sustancia Vehículo 2	5,12 ± 0,63	1	2a	9a
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.

a p<0.05 (Difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística.

Ahora realizando un análisis de estas mismas variables pero inducidas con la administración de CF vía I.P encontramos que este mutágeno indujo la formación de 175-192

células con aberraciones, considerado entonces como un potente inductor de aberraciones de tipo estructural (16,21, 22,24). El número de células con poliploidía encontradas estuvo en el orden de entre 14-18 y el índice mitótico experimento un descenso significativo al compararlo con los controles estando en el rango de entre 3,89-3,93%. Por su parte la inducción de metafases con aberraciones de tipo Gaps difirió con los valores espontáneos encontrados estando entre 44-47 (16, 21, 22, 24).

En ratas SD se obtuvieron un total de 17-23 células totales con aberraciones y de 4-8 metafases con aberraciones de tipo Gaps, ambos valores de tipo basal. Los valores basales de células con poliploidías se encuentran entre 1-3 y el índice mitótico entre 4,81-5,29, Estos valores espontáneos difirieron significativamente con los obtenidos por la CF, además concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en investigaciones realizadas con anterioridad, lo cual valida la repetitividad y eficiencia de esta prueba (21) a partir de nuestra experiencia. La CF indujo entre 220-246 células totales con aberraciones esta especie de rata. Además el rango de células con aberraciones Gaps fue entre 62-69. Así mismo el número de células con poliploidía estuvo en el orden de 23-28 células y el índice mitótico experimento igualmente un marcado descenso al compararlo con los controles estando entre 3,40-3,58% (21).

Los resultados de la comparación entre ambas especies en el ensayo de AC arrojaron que el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentado un menor número de células con aberraciones, aberraciones de tipo Gaps, además un menor número de células con poliploidía y un mayor porcentaje de células en metafase (índice mitótico). Por otro lado las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, la cual indujo en las ratas mayor número de células con aberraciones, mayor frecuencia de células con aberraciones tipo Gaps, y un número mayor de células con poliploidía. De igual forma la CF indujo en ratas SD un menor porcentaje de células en metafases. Pudiera entonces utilizarse ratas SD en este ensayo para determinar actividad genotóxica de nuevos fármacos que induzcan daño al ADN por efecto alquilante, como clastógeno químico (25,26), permitiendo determinar el mecanismo de daño de nuevas drogas. Además de mimetizar en gran medida el efecto de esta droga en el hombre por ser las ratas SD una especie totalmente heterogénea.

Conclusiones

En el ensayo de micronúcleos el biomodelo ideal fue el ratón BALB/c, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF. Por su parte en el ensayo AC el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentado 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.

Referencias Bibliográficas

1. Mortelmans K, Rupa D, 2004. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 56:379-397.
2. Mortelmans K, Zeiger E, 2000. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 455:29-60.
3. García L, Sureiro RA, Garrido MJ. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, 2000, 109-110.
4. Cox SH, Ann M. *Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing*. Second Edition, Revised and Expanded. Research Triangle Park, North Carolina, 1999, 178-179.
5. Schmid W, 1975. The micronucleus assay validation. *Mutation Research* 24:9-11.
6. Alamone MF, 1994. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frecuencies. *Environ Mol Mutag* 23:239-240.
7. Arencibia, DF, Rosario LA, 2010. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 27(1):1-8.
8. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A, 2010. The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. *VaccniMonitor* 19(Suplement 2):245.
9. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A, 2011. The mice as ideal biomodel in the genotoxicity assays, Finlay Institute, Cuba. *Revista Salud Anim* 33(1).
10. CCAC. Canadian Council on Animal Care Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc, 1997, 155-162.
11. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, 2006. Effects of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs in R&D* 7:233-241.
12. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML, 2005. Therapeutic effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res* 31:193-198.
13. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer W, 2000. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Androl* 44:147-154.
14. Shayne CG. *Animal Models in toxicology*. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. *Toxicology: Chapter 2 and 3. The Mouse and Rats*. 2nd ed. LLC edition. New York: (U.S.A), 2007, 24-162.
15. Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L, 2011. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor* 20(1):28-33.

16. Arencibia DF, Rosario LA, Hernández Y, 2010. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. Rev Cub de Farm 44(4):503-511.
17. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodríguez E. Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España, 2006, 2-3.
18. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D, 2009. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel 25(3):22-38.
19. Arencibia D.F, Rosario L.A, Morffi J, Curveco D, 2009. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel 23(3):23-40.
20. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H, 2009. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, mediante el Ensayo de Micronúcleos. Rev Cub Farm 43(2):1-8.
21. Arencibia DF, Rosario LA, 2010. Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. Retel 28(1):1-14.
22. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, Goicochea E, 2010. Efectos del D-003, mezcla de Ácidos Alifáticos en el ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vivo*. Rev Cub Farm 44(2):213-220.
23. Arencibia DF, Rosario LA, 2010. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. Retel 29(1):1-15.
24. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D, 2010. 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. Rev Vet Arg 27(269):1-10.
25. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ, 2001. Effect of Mangifera indica L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. Phytotherapy Research 15:581-5.
26. Prieto G, Errecalde C, Trotti N, 1999. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monog Med Vet 19(2):1-8.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar