



SENSIBILIDAD DE DISTINTAS LÍNEAS MURINAS A LA CICLOFOSFAMIDA MEDIDA A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA.

Daniel Francisco Arencibia-Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario-Fernández², Yolanda Emilia Suárez-Fernández³.

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

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

³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Mayabeque, Cuba.

darencibia@finlay.edu.cu

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sensibility of different murine lines to the cyclophosphamide (CF) measure through the micronucleus assay in bone marrow cells. Being used mice of both sexes of the Balb/c, NMRI, OF-1 and C57BL/6/cenp lines. The use of the best line was suggested in this assay on the base of significant appearance of low indexes spontaneous and high induced indexes to the CF. It was obtained as a result that the Balb/c line in both sexes differs significantly of the other evaluated lines. In this line the lowest results in cytotoxicity index (relationship among young erythrocytes/mature erythrocytes) and genotoxicity indexes (erythrocytes percent in bone marrow with micronucleus) were observed, at the same time of responding from an acceptable form to the CF. Also the line C57/BL6/cenp was the less efficient and more sensitive to the mutagen, being obtained the highest spontaneous and induced results. These results allow to suggest that the Balb/c mice, is the most appropriate line to use as biomodel in the micronucleus assay, when it is used the CF as positive control.

Key words: Micronucleus assay, mice, bone marrow, cyclophosphamide.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida (CF) medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. Siendo utilizados ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp. Se sugirió el uso de la mejor línea en este ensayo sobre la base de aparición significativa de índices espontáneos bajos e índices inducidos altos a la CF. Se obtuvo como resultado que la línea Balb/c en ambos sexos difiere significativamente de las demás líneas evaluadas. En esta línea se observaron los resultados más bajos de índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos maduros) y genotoxicidad (porcentaje de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos), a la par de responder de forma aceptable a la CF. Además la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y más sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos e inducidos más altos. Estos resultados permiten sugerir que la línea de ratones Balb/c, es la más apropiada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo.

Palabras clave: Ensayo de micronúcleos, ratones, médula ósea, ciclofosfamida.

INTRODUCCIÓN

Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer (Hecht, 2002; Mortelmans y Rupa, 2004).

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 (Stoneham *et al.* 2000; García *et al.* 2000).

Por lo general los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de 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 (Autor *et al.* 2009). Las autoridades regulatorias tales como la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) y EPA (Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos), 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 (Tice *et al.* 1994; OECD, 1997; Autor *et al.* 2009).

Existen en nuestros días una amplia gama de ensayos de genotoxicidad, con el fin de que los investigadores los utilicen de forma estratégica y sensata los más conveniente posible según las propiedades del producto a evaluar y las condiciones de equipamiento. Estas condiciones incluyen personal califi-

cado, materiales, medios, disponibilidad de equipamiento, experiencia en la técnica evaluativa y en la interpretación científica. Permitiendo de esta forma poder darle una explicación real y veraz a los resultados obtenidos (Autor *et al.* 2009).

Dado que la mayoría de estos ensayos son bastante caros es conveniente que se elija cuál realizar y nunca se realicen estudios que determinen el mismo daño, pues se consideran repetitivos.

Como parte de la evaluación toxicológica se realiza el tamizaje de la potencialidad genotóxica (determinar la toxicidad a nivel de ADN, genes y cromosomas), dentro de la cual los ensayos *in vivo* dan el mayor peso de la conclusión final de si la sustancia investigada es o no mutagénica y/o genotóxica. Dentro de estos ensayos se encuentra el de electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa), evaluando el daño a nivel de la estructura primaria del ADN, el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en médula ósea de roedores el cual determina la ocurrencia o no de daño en cromosomas y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en roedores determinando el efecto genotóxico a nivel celular (Autor *et al.* 2009).

Durante las investigaciones de un mismo producto a evaluar mediante el tamizaje genotoxicológico se utilizan diferentes líneas sin tener en cuenta, la más eficiente para detectar daño en el ADN. Además de que las líneas de ratones producidas en nuestro país hasta el momento no habían sido evaluadas y/o exploradas teniendo en cuenta su eficiencia genética para detectar sustancias con baja, media o alta genotoxicidad. Además el estudio profundo de nuestros biomodelos permitirá utilizar el mínimo de animales y obtener resultados fiables; por lo que disminuirán las repeticiones de estos estudios tan costosos y fastidiosos.

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia espontánea e inducida de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética en el biomodelo a utilizar, así podremos darnos cuenta si estamos frente a una sustancia mutagénica y/o genotóxica, y si estamos en presencia) 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 (Autor *et al.* 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida (CF) medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. Siendo utilizados ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp. Fue sugerido el uso de la mejor línea en este ensayo sobre la base de aparición significativa de índices espontáneos bajos e índices inducidos altos a la CF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos internacionales para el uso de los animales de Laboratorios (CCAC, 1997).

Grupos experimentales

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administró en el horario de 10:30-11:30 a.m. y las concentraciones a administrar de cada sustancia se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratones/grupo/sexo.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante 14 días.

En el grupo experimental 2 se utilizó Tween 65 al 2%, como vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo (Carbajal *et al.* 2005; Arruzabal *et al.* 2006). En el grupo experimental 3 se utilizó NaCl al 0,9% como segundo grupo solvente, ya que está demostrado que el mismo es el disolvente

de la mayoría de las sustancias hidrofílicas a preparar (Shayne, 2007). Ambos productos fueron preparados 2 horas antes de la administración; se administraron por vía oral durante 14 días.

En el grupo experimental 4 se utilizó como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal, mutágeno adquirido por la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, el cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9% (Autor *et al.* 2009a). La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, 48 horas y luego a las 24 horas antes de la eutanasia (Wyrobek, 1983; Rossello *et al.* 2006; Autor *et al.* 2009b).

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.

Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó gentilmente por flujo introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 3 ml de suero bovino fetal (SBF). La médula así obtenida diluida con el SBF 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 (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b). Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b). Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal para calcular el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos. Ade-

más se procedió a calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad y cuantificar el número de MN totales (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b).

Eutanasia

A todos los animales se les practicó la eutanasia por dislocación cervical en previa atmósfera de éter teniendo en cuenta el tiempo de exposición a cada una de las sustancias evaluadas (Shayne, 2007).

Análisis estadístico

La frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El número total de MN se analizó mediante la prueba de Chi-cuadrado, ambos tipos de variables se analizaron estableciendo a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$ (Autor *et al.* 2009b). Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

Los resultados del ensayo de micronúcleos para las cuatro líneas de ratones evaluadas se encuentran en la (Tabla I y II). Para la línea Balb/c el índice de citotoxicidad (EP/EN), se encuentra en el rango espontáneo de 1,16-1,19 para el caso de los machos 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 % en los machos y en las hembras están en el rango de 0,13-0,17 %.

En tanto 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 en el rango de 0,18-0,21 % en los machos y de 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 las hembras esta entre 1,12-1,15. 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/cenp, se encontró que el índice de citotoxicidad era de 1,12-1,14 en los machos y en las hembras se encontró en el intervalo de 1,09-1,12, estando esta relación en el intervalo más bajo por lo cual esta línea 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 % de EP portadores de micronúcleos.

Al comparar los resultados espontáneos e inducidos en las variables analizadas entre líneas de ratones se obtuvo como resultado que la línea Balb/c difiere con las demás evaluadas en ambos sexos. Esta comparación se realizó para variables continuas utilizando la prueba de ANOVA ($p<0.05$) y para variables categóricas utilizando la prueba de Chi-Cuadrado ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

En ninguno de los estudios realizados se evidenció síntomas clínicos indicativos de toxicidad. Reafirmando que la dosis utilizada en las sustancias evaluadas en este ensayo no fueron altamente tóxicas a nivel sistémico pero se logró un efecto importante en las células dianas analizadas (Autor *et al.* 2009a; Autor *et al.* 2009c).

Teniendo en cuenta el ensayo evaluado se obtuvo como resultado que la línea Balb/c difirió con las otras tres líneas evaluadas en ambos sexos. Las diferencias estuvieron dadas al tener en cuenta el índice de citotoxicidad obtenido de la relación eritrocitos policromáticos (EP)/eritrocitos normocromáticos (EN), el índice de genotoxicidad (% de EP que contienen micronúcleos), así como el número de EP con MN como índice de severidad del daño. En esta línea se obtuvieron los resultados espontáneos más bajos e inducidos más altos, destacándose la sensibilidad de este biomodelo animal para detectar compuestos clastogénicos (Gámez *et al.* 2000; Autor *et al.* 2009a; Autor *et al.* 2009c; Autor *et al.* 2010a).

Los resultados espontáneos e inducidos con CF obtenidos en esta línea de ratones Balb/c concuerdan con los obtenidos por varios autores y nuestro grupo de trabajo (Gámez *et al.* 2000; Lóriga *et al.* 2001; Fraga *et al.* 2001; Mañas *et al.* 2006; Autor *et al.* 2011), en los grupos controles, tratados con sol-

ventes y CF en la dosis utilizada en este ensayo.

La línea de ratones C57BL/6/cenp fue la menos eficiente, encontrándose los índices de daños espontáneos más altos, pero a su vez fue la más sensible al daño clastogénico logrado por la CF en células de la médula ósea. Las diferencias significativas entre líneas de ratones a la acción genotóxica de la CF pudieran ser en respuesta a diferentes niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima citocromo P-4501A1 en el hígado. Entre líneas de una misma especie se han observado diferencias epigenéticas al tener en cuenta esta enzima hepática fundamental en la fase I del metabolismo de xenobióticos, que participa en el metabolismo de la CF en el hígado al utilizarse como droga citotástica (Amri *et al.* 1986; Jana *et al.* 1998).

Para que esta droga se metabolice es necesario la activación en los microsomas hepáticos, en un primer paso a hidroxiciclofosfamida, transformándose espontáneamente a aldofosfamida, y posteriormente en las células blanco se convierte en mostaza fosforamida, del que surgen cuatro metabolitos: -mostaza fosforamida (activo), acroleína, carboxifosfamida y 4-ceofosfamida que son escasamente activos. La CF es inactivada por enzimas microsomas y hepáticas con participación activa de la citocromo P-450 (Rezvanfar *et al.* 2008).

Al comparar el biomodelo ratas Sprague Dawley (SD) y ratones Balb/c de ambos sexos en el ensayo de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, nuevamente los ratones de esta línea experimentaron los índices endógenos de daño más bajos e inducidos altos (Autor *et al.* 2011a).

Demostrándose que genéticamente la línea de ratones Balb/c en ambos sexos es más estable que las otras evaluadas y que las ratas SD, además de haber presentado una respuesta aceptable a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

El hecho de que los ratones Balb/c hayan resultado ser la línea más apropiada en este ensayo que las otras líneas de ratones y ratas SD al tener en cuenta los índices endógenos evaluados, pudiera estar dado por la baja tasa de variabilidad genética de esta línea al ser isogénica, lo cual constituye una ventaja al evaluar el efecto genotóxico de drogas mediante este ensayo, pero a su vez no obtendremos una respuesta heterogénea, la cual es típica en poblaciones humanas. Mediante este análisis sugerimos que la línea de ratones Balb/c, es la más apro-

piada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo, ya que permite detectar en un estrecho margen de error aquellas sustancias que sean clasificadas de muy baja genotoxicidad, además de responder de forma aceptable a clastógenos químicos como la CF. Estos resultados conducen a una mejora en la robustez de esta prueba. A su vez permitirán clasificar con mayor grado de exactitud aquellas sustancias que al igual que la CF, logren formar monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas con la consecuente aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos; aumentando la aparición de retardos anafásicos en células somáticas (Matuo *et al.* 2007; Rezvanfar *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

La línea de ratones Balb/c en ambos sexos difiere significativamente de las demás líneas evaluadas. En esta línea se observaron los resultados más bajos de índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos maduros) y genotoxicidad (porcentaje de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos), a la par de responder de forma aceptable a la CF. Además la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y más sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos e inducidos más altos. Los resultados del presente trabajo, permiten sugerir que la línea de ratones Balb/c, es la más apropiada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo.

Grupo	n	EP/EN	MN totales	MN-EP (%)
Ratones Balb/c de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,18 ± 0,01d	23d	0,16 ± 0,03d
Sustancia Vehículo 1	10	1,16 ± 0,04d	26	0,18 ± 0,04d
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,05d	25d	0,18 ± 0,04d
Control Positivo (CF)^a	10	0,87 ± 0,03*d	258*d	1,82 ± 0,89*d
Hembras				
Control Negativo	10	1,15 ± 0,05d	19	0,13 ± 0,04d
Sustancia Vehículo 1	10	1,17 ± 0,02d	20d	0,14 ± 0,07d
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,04d	24d	0,17 ± 0,08d
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*

Tabla I. 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.

CF (Ciclofosfamida) .^a Administración por vía intraperitoneal. Determinación in 2000 células/animal y en 2000 EP/animal. *p<0.05 (comparación contra el control, prueba de ANOVA). (X media; SD desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0.05 (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.

Grupo	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/cenp 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*

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

CF (Ciclofosfamida) .a Administración 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; SD desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0.05 (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.

BIBLIOGRAFÍA

- Amri H., Batt A., Siest G. (1986). Comparison of cytochrome P-450 content and activities in liver microsomes of seven species including man. *Xenobiotic*. 16:351-358.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Suárez Y.E., Delgado L. (2010a). El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos. *Retel*. 31(3):21-31.
- Arencibia D.F., Gutiérrez A., Gámez R., Pardo B., Curveco D., García H. (2009a). Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. *Rev Cub Farm*. 43(2):8-9.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Rodríguez Y., Martín Y., Díaz D. (2009c). Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel*. 24(2):7-29.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., Curveco D. (2009). Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel*. 23(3):23-40.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., Curveco D. (2009b). Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*. 25(3):22-38.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Suárez Y.E., Vidal A. (2011a). Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Química Viva*. 10(2):17-21.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Vidal A. (2010). The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. *VacciMonitor*. 19(Suplement 2):245.
- Arencibia D.F., Vidal A., Rosario L.A., Suárez Y.E., Delgado L. (2011). Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*. 20(1):28-33.
- Arruzazabala M.L., Mas R., Molina V. (2006). Effect of D-004, a lipid extracts from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R&D*. 7:233-241.
- Carbajal D., Molina V., Más R., Arruzazabala M.L. (2005). Therapeutic effect of D-004, a lipid extracts from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs. Exptl. Clin. Rest*. 31:193-198.
- CCAC. (1997). 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; Canada. p. 155-162.
- Fraga J.R., Domínguez Y., Friman M., González S.B., Somoza A.D., Pérez C. (2001). Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirosis vax-SPIRAL® empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. *An. Toxicol*. 1(1):35-39.
- Gámez R., Fernández I., Acosta P.C., Alemán C., Rodeiro G., Rodríguez M. (2000). Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev. CENIC*. 31(3):211-216.
- García L., Sureiro R.A., Garrido M.J. (2000). Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: X Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental. p.108-109.
- Hecht S.S. (2002). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Molec. Mutag.* 39(2):119-126.
- Jana N.R., Sarkar S., Yonemoto J., Tohyama C., Sone H. (1998). Strain differences in cytochrome P451A1 gene expression caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver: Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 248:554-558.
- Lóriga E., Alfonso B., Socorro M., Ortega J., Pomares Y. (2001). Evaluación genotóxica de la vacuna VAMENGOC-BC® empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. *An. Toxicol*. 1(1):25-29.
- Mañas F., González M.B., García H., Weyers I., Ugnia L., Larripa IB., Gorla N. (2006). La genotoxicidad del herbicida Glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *THEORIA*. 15(2):53-60.

- Matuo R., Oliveira R.J., Silva A.F., Mantovani M.S., Ribeiro L.R. (2007). Anticlastogenic activity of aqueous extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing cells (HTCs) during cell cycle. *Toxicol. Mecha. Method.* 17(3):147-152.
- Mortelmans K., Rupa D. (2004). Current Issues in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Adv. Applied. Microbiol.* 56(3):379-397.
- OECD. (1997). Guideline for the testing of chemical. *Directrices de OECD TG 475 (Genetic Toxicology: In vivo Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells)*. Anex B11; USA. p. 5-6.
- Rezvanfar M.A., Sadrkhanlou R.A., Ahmadi A., Shojaei H., Rezvanfar M.C., Mohammadirad A. (2008). 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. *Hum. Exp. Toxicol.* 27:901-910.
- Rossello P., Olivé J., Munuera E., Gonzáles T.H., Rodriguez E. (2006). 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. p. 2-3.
- Shayne C.G. (2007). Animal Models in toxicology. Chapter 2, The Mouse. *Toxicology*. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC. p. 24-72.
- Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V., Gill L. (2000). Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J. Epidemiol.* 134(2):756-760.
- Tice R.R., Hayashi M., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mut. Res.* 312:305-312.
- Wyrobek A.J. (1983). An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res.* 115(3):73-148.