

Comparación entre dos biomodelos murinos (ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley) en el ensayo de micronúcleos transplacentarios

Comparison between two murine biomodels (Balb/c mice and Sprague Dawley rats) in a transplacental micronucleus assay

Dr. Daniel Francisco Arencibia Arrebola,^I MSc. Luis Alfredo Rosario Fernández,^{II} Dra. C. Yolanda Emilia Suárez Fernández,^{III} MSc. Livan Delgado Roche^{IV}

^I Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

^{II} Instituto de Farmacia y Alimento Universidad de La Habana. (IFAL-UH). La Habana, Cuba.

^{III} Universidad Agraria de la Habana (UNAH). Mayabeque, Cuba.

^{IV} Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: comparar fetos de ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley como biomodelos en el ensayo de micronúcleos transplacentarios, determinando la frecuencia espontánea e inducida, y vincular el efecto genotóxico y reproductivo.

Métodos: se formaron tres grupos experimentales/especie: control negativo (simulacro), control solvente NaCl (0,9 %) y ciclofosfamida 50 mg/kg. Todos los grupos se administraron por vía intraperitoneal los días 14, 15 y 16 de la gestación, y 24 h después de la última inoculación en ratones y 48 h en ratas se procedió a realizar la eutanasia de las gestantes, para obtener las muestras de hígado fetal.

Resultados: los fetos de ratas Sprague Dawley demostraron tener menores índices de citotoxicidad y de genotoxicidad, y se obtuvieron los resultados más bajos de micronúcleos endógenos. Los mejores resultados de inducción de citotoxicidad y genotoxicidad por la alta formación de micronúcleos con ciclofosfamida fueron en fetos de ratas Sprague Dawley, los que resultaron más susceptibles al daño genotóxico de este mutágeno. Se corroboró el poder clastogénico transplacentario de la ciclofosfamida, vinculando este ensayo de genotoxicidad a toxicología de la reproducción.

Conclusiones: los resultados sugieren el mejor uso de fetos de ratas Sprague

Dawley como biomodelo en este ensayo cuando es utilizada la ciclofosfamida como control positivo por la vía y dosis estudiada; además, se pudieran utilizar en la evaluación de nuevas drogas con carácter antigenotóxico por vía transplacentaria.

Palabras clave: micronúcleos transplacentarios, ratones Balb/c, ratas Sprague Dawley, genotoxicidad.

ABSTRACT

Objectives: to compare fetuses from Balb/c mice and Sprague Dawley rats as biomodels in transplacental micronuclei assay and to determine the spontaneous and induced frequency to link the genotoxic and reproductive effect.

Methods: three experimental groups by species were formed: a negative control (simulation), NaCl (0.9 %) solvent control and 50 mg/kg cyclophosphamide. All the groups were intraperitoneally administered at 14th, 15th and 16th days of gestation, and 24 h after the last inoculation in mice and 48 h in rats, it proceeded to perform euthanasia in the pregnant animals to obtain the fetal liver samples.

Results: the fetuses from Sprague Dawley exhibited smaller cytotoxicity and genotoxicity indexes, and the lowest endogenous micronucleus results. The best results of the cytotoxicity and genotoxicity induction for the high micronucleus formation with cyclophosphamide were found in Sprague Dawley rat fetuses, being more susceptible to the genotoxic damage by this mutagen. The clastogenic transplacental power of cyclophosphamide was confirmed whereas this genotoxicity assay was linked to reproduction toxicology.

Conclusions: these results suggest that the Sprague Dawley rats fetuses could be better used as biomodels in this assay when cyclophosphamide is employed as positive control through the way of administration and the studied dosage. It could be similarly used in the evaluation of new antigenotoxic drugs with antigenotoxic effect through transplacental administration

Key words: Transplacental micronucleus, Balb/c mice, Sprague Dawley rats, genotoxicity.

INTRODUCCIÓN

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo 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.¹⁻⁴

Está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración la farmacocinética y los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado.^{5,6}

Estudios realizados con la ciclofosfamida (CF) demuestran una íntima relación entre el daño cromosómico causado en el hígado fetal (utilizando el ensayo de micronúcleos transplacentarios) y el efecto teratogénico causado por esta sustancia. *Porter y Singh* plantean la hipótesis de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez.^{7,8}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la comunidad de toxicólogos a nivel mundial busca la integración de estudios que respondan a la "3 R", donde se reduzcan al máximo el uso de los animales de laboratorios. Además de ser conocida la relación existente entre embriotoxicidad, teratogénesis y genotoxicidad; ya que la expresión del daño genético en células germinales tanto en la madre como en el padre se manifiesta generalmente como infertilidad, abortos espontáneos, muertes embrionarias y reducción del peso fetal.

Es de vital importancia en la evaluación genotoxicológica el uso de biomodelos experimentales eficientes. Por lo cual se hace necesario que estos expresen la menor frecuencia de aparición de cabezas morfológicamente anómalas, 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. Además, el hecho de utilizar fetos o animales recién nacidos para determinar el efecto genotóxico de una droga, hace aun más susceptible los ensayos de genotoxicidad.⁷

A partir de esta problemática surge la necesidad de realizar una comparación en cuanto a la frecuencia basal e inducida con CF, entre ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley (SD), en el ensayo de micronúcleos transplacentarios. Se pretende vincular de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología. Además realizar la caracterización basal de este fenómeno en la línea de ratones Balb/c y SD, la cual hasta el momento aún no ha sido evaluada.

Solamente se utilizaron en este estudio 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 que en ratones adultos de ambos sexos de esta línea se encontraron los niveles más bajos de frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea; así como la alta sensibilidad a sustancias mutagénicas como la CF al ser comparados estos índices con las líneas OF-1, NMRI y C57/BL6/cenp.^{9,10} De esta misma forma utilizamos solamente ratas de la línea Sprague Dawley. Siendo esta línea la de más bajos niveles de frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea, al ser comparada con las líneas Lewis y Wistar.^{11,12}

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de la línea Balb/c vírgenes de ambos sexos,^{9,10} de 9 semanas de edad y fértiles, con un peso vivo entre 25-30 g. Además se emplearon ratas Sprague Dawley vírgenes de ambos sexos, de 8 semanas de edad, con un peso vivo entre 180-210 g al término de la cuarentena. Se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad relativa (60 ± 10 %) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*, y pienso estándar para esta

especie. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos internacionales establecidos para la investigación con animales de laboratorio.¹³

Apareo

Pasado el tiempo de cuarentena fueron sometidos al esquema de apareo a razón de 1 macho por cada 2-3 hembras. Aquellas hembras en las que se constató la presencia del tapón espermático al día siguiente del apareo, se les consideró este como el día cero de la preñez.¹⁴

Administración y dosificación

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m., y las concentraciones se ajustaron en función del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (8 hembras/grupo/especie), para un total de 16 hembras/grupo/especie en las dos réplicas realizadas.

El grupo experimental 1 (control negativo), estaba formado por ratones y ratas hembras, a las cuales se les realizó la técnica de inoculación de sustancia por vía i.p., como simulacro para que estuvieran expuestas a las mismas condiciones de manejos que los demás grupos.

En el grupo experimental 2 se utilizó como control solvente el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 %, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99 % de pureza, administrado por vía i.p. en dosis de 10 mL/kg y preparado 2 h antes de su uso.

En el grupo experimental 3 se empleó la CF (adquirida de la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca de LEDOXINA), utilizada en dosis de 50 mg/kg.^{9,14} La CF se administró por vía i.p.⁷ y se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %. Se administró a razón de 10 mL/kg, preparada 2 h antes de su uso.

Se realizó la administración en cada grupo experimental los días 14, 15 y 16 de la gestación, y 24 h después de la última inoculación se procedió a la eutanasia de las gestantes por dislocación cervical, con previa atmósfera en éter para el caso de los ratones,¹⁴ para el caso de las ratas la eutanasia se realizó 48 h después de la última inoculación por sobredosis de anestésico por vía intravenosa (tiopental sódico). Se obtuvieron las muestras de hígado fetal.¹⁴

Exámenes realizados

Micronúcleos transplacentarios en hígado fetal

Al extraer los fetos, para ser analizados se redujo la camada a 5 fetos/animal, que fueron los analizados.¹⁴ Se realizó una ligera incisión en la cavidad abdominal, extrayendo el hígado en su totalidad.⁷ Luego se depositó en un mortero estéril que contenía entre 4-5 mL de suero bovino fetal, y con ayuda de una malla metálica se procedió a la maceración. Una vez macerado se centrifugó el líquido a 1 000 rev/min durante 10 min y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos.¹⁴ Después de montadas las láminas (mínimo: 2/feto) se mantuvo durante 24 h a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 min,^{7,14} para luego establecer una tinción en Giemsa al 5 % durante 12-15 min.¹⁴ Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos

observadores independientes y las observaciones se efectuaron "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión).^{2,3,14} Se calculó el % de eritrocitos policromáticos (EP) portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/feto (MN-EP %),^{7,14} como índice de genotoxicidad según los requisitos establecidos.^{1,2} Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP entre eritrocitos normocromáticos (EN) de la población total de eritrocitos (EP/EN), el % de EP en 2 000 células totales, total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo para determinar el grado de genotoxicidad.^{2,3,14}

Análisis estadístico

Se consideró la camada como unidad experimental.¹⁵ Tanto el índice de citotoxicidad (EP/EN), el índice de genotoxicidad (MN-EP %) y el % EP, se evaluaron por la prueba de análisis de varianza (ANOVA), corroborando que eran cumplidos los supuestos, datos distribuidos normalmente (normalidad, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov), que existía dependencia entre las observaciones y presentaban homogeneidad de varianzas (prueba de Levene).^{14,15} Para determinar los grupos experimentales que diferían se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para el caso de la comparación del total de MN y del grado de genotoxicidad, dado por el número de EP totales con 1 MN, 2 MN y >2 MN, se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado;^{14,15} el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0,05$ para variables continuas y de $\alpha = 0,01$ para variables categóricas. Todo el análisis se realizó empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

Al realizar el análisis de los índices de citotoxicidad y de genotoxicidad en células hepáticas de fetos (tabla), se observa que no hubo diferencias significativas entre controles, sí entre estos y los resultados en los dos mutágenos utilizados en las dos especies evaluadas. El índice de citotoxicidad espontáneo en células hepáticas fetales de ratones hallado se encontró en el rango de $1,01 \pm 0,06$ y el % de EP con MN entre 0,31-0,35 %, con una desviación estándar de 0,10-0,16. De igual forma el % de EP espontáneos en fetos de ratones Balb/c estuvo en el rango entre $50,35 \pm 0,55$.

En cambio, el índice de citotoxicidad espontáneo para fetos de ratas estuvo entre $1,07 \pm 0,05$ y el % de EP con MN fue de 0,19-0,29, % con una desviación estándar de 0,09-0,14. Para el caso de fetos de ratas SD, el % EP fue de 51,75-52,4 %

Para el caso de los fetos de ratones, el índice de citotoxicidad inducido con CF 50 mg/kg encontrado estuvo en el rango de $0,43 \pm 0,10$ y el % EP portadores de MN fue de $4,86 \pm 0,29$. Se logró inducir hasta 713 MN totales en 2 000 células analizadas, a la par se observó una disminución considerable del % EP hasta $30,1 \pm 0,41$ %.

En fetos de ratas SD se obtuvo un índice de citotoxicidad inducido entre $0,39 \pm 0,21$ y el % EP portadores de MN hallados fue de $5,67 \pm 1,89$. Este mutágeno logró inducir hasta 806 MN totales en 2 000 células analizadas y logró disminuir el % EP con valores promedios entre $28,55 \pm 0,50$.

Tabla. Comparación en el (EP/EN), índice de genotoxicidad (MN-EP %) y total de micronúcleos por nivel de daño en células hepáticas de fetos de ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley

| Grupo experimental | EP | EN | % EP | EP/EN ^F | MN-EP (%) ^F | T-EP/SMN ^G | MN ^G | EP (1MN) ^G | EP (2MN) ^G | EP (+ 2MN) ^G |
|-------------------------------------|------------|-------------|----------------|--------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Fetos de ratones Balb/c | | | | | | | | | | |
| Control negativo | 1007 ± 10 | 993 ± 10 | 50,35 ± 0,49 | 1,01 ± 0,04 | 0,31 ± 0,10 | 1954 | 46 | 29 | 15 | 2 |
| Control solvente (NaCl 0,9 %), i.p. | 1011 ± 11 | 989 ± 11 | 50,55 ± 0,55 | 1,02 ± 0,06 | 0,35 ± 0,16 | 1949 | 51 | 30 | 19 | 2 |
| Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p. | 602 ± 8c | 1398 ± 8c | 30,1 ± 0,41c | 0,43 ± 0,10c | 4,86 ± 0,29c | 1287c | 713c | 515c | 167c | 31c |
| Fetos de ratas Sprague Dawley | | | | | | | | | | |
| Control negativo | 1048 ± 6a | 952 ± 6a | 52,40 ± 0,31a | 1,10 ± 0,03a | 0,19 ± 0,09a | 1972 | 28a | 17a | 10 | 1 |
| Control solvente (NaCl 0,9 %), i.p. | 1035 ± 12a | 965 ± 12a | 51,75 ± 0,60a | 1,07 ± 0,05a | 0,29 ± 0,14a | 1959 | 41 | 25 | 15 | 1 |
| Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p. | 571 ± 10ac | 1429 ± 10ac | 28,55 ± 0,50ac | 0,39 ± 0,21ac | 5,67 ± 1,89ac | 1194ac | 806ac | 583ac | 180ac | 43ac |

EP/EN: índice de citotoxicidad; MN-EP (%): índice de genotoxicidad; ^F: determinación en 2 000 células/feto, p < 0,05 comparación contra el control negativo, ANOVA y prueba de comparaciones múltiples con Tukey; media; desviación estándar de 5 fetos/animal de 16 animales/grupo.

^G: determinación en 2 000 EP/feto de 5 fetos/animal de 16 animales/grupo, p < 0,01 comparación contra el control negativo, prueba de chi cuadrado.

T-EP/SMN: total de eritrocitos policromáticos sin MN. a: difieren al comparar los resultados entre especies. c: difieren al comparar los resultados contra el control negativo en la misma especie. En ambas comparaciones, para las variables ^F se realizó ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples con Tukey.

Los índices espontáneos e inducidos con CF difieren entre fetos de las dos especies evaluadas tanto para las variables continuas (p < 0,05) como para las variables categóricas (p < 0,01).

DISCUSIÓN

Tal y como lo demuestran los resultados, el índice de citotoxicidad espontáneo fue mayor en fetos de ratas que en ratones, lo que difiere significativamente para p < 0,05, por lo que los fetos de ratas presentan un menor daño basal en cuanto a la proliferación celular, es decir, es más alto el número de células que produce la médula ósea que aquellas que mueren por muerte celular programada (apoptosis).^{16,17} Por otro lado, los resultados del índice de genotoxicidad espontáneo difirieron de forma significativa entre ambas especies, siendo los fetos de ratas los que manifiestan menor daño endógeno ya que se encontraron en los fetos de esta especie un menor % EP portadores de MN.

Analizando los resultados encontrados con el uso de la CF, estos difieren con el grupo control y solvente en ambas especies evaluadas (p < 0,05), lo cual valida los resultados de inducción de daño genotóxico encontrados en nuestro diseño experimental, a la vez confirma el uso de la CF como mutágeno activo en materia de reproducción,¹⁸ por lo que resulta útil en estudios de teratogénesis y para el descubrimiento de drogas con carácter antígenotóxico en la preñez.¹⁹ Además se corroboró el poder clastogénico transplacentario de la CF vinculando este ensayo de genotoxicidad a toxicología de la reproducción.

Al comparar los resultados inducidos entre especies, se observa que ambos índices difieren entre fetos de ratones y de ratas. El hecho de que en fetos de ratones Balb/c se hayan encontrado los índices de citotoxicidad más altos inducidos con CF, demuestra la gran resistencia de esta línea de ratones al daño de potentes sustancias genotóxicas,^{9,10,20} lo cual a nuestro modo de ver no lo hace ser el mejor biomodelo experimental en este ensayo, ya que enmascararía la acción de sustancias que tienen

poco efecto citotóxico cuando en realidad lo son. Por otro lado, el hallazgo de que el índice de citotoxicidad en fetos de ratas haya sido menor de forma inducida y mayor basalmente que en fetos de ratones Balb/c, presupone el mayor uso de fetos de ratas en este ensayo ya que estas presentan un bajo daño citotóxico y a su vez son muy sensibles a las sustancias mutagénicas,²¹ responden a estas sustancias de forma exacerbada; lo cual permite con mayor sensibilidad el tamizaje de sustancias mutagénicas y genotóxicas por vía transplacentaria.

La comparación del % EP con MN entre especies nuevamente mostró que el mejor biomodelo resultó ser los fetos de ratas SD, ya que en estos se encontraron los porcentajes más altos de daño genotóxico y difirieron con los porcentajes encontrados en fetos de ratones. Estos resultados permitirán utilizar con mayor eficiencia fetos de ratas SD en el ensayo de micronúcleos, lo que está en mayor concordancia con el efecto que se logrará en el humano ya que las ratas SD son no consanguíneas, por ende, es una línea no isogénica, simulando de forma más real el efecto del fármaco a evaluar en la población humana. Además se puede apreciar que la CF en ambas especies induce una alta formación de EP con más de 2 MN, por tanto, manifiesta un alto grado de genotoxicidad y es mayor en los fetos de ratas SD, resultados que difieren entre especies.

Al comparar los índices inducidos con CF se debe tener en cuenta el metabolismo del producto que se esté evaluando, ya que en numerosos estudios se evaluó la comparación de expresión de genes para la enzima citocromo P-450 y sus subclases tanto frente a fármacos como a diferentes especies animales en cuanto al metabolismo.^{22,23} Se llegó a la conclusión que existen diferentes niveles de expresión y que estos están determinados fundamentalmente por la especie en que se evalúe.^{22,23} Por tanto, el factor preponderante pudiese ser la tasa de expresión de estos genes que al parecer son mayores en fetos de ratas que en ratones, ya que al lograrse una mayor tasa de metabolización del mutágeno se logra un mayor daño. Se conoce que la CF es inactivada por enzimas microsomales y hepáticas con una acción fuerte de la enzima citocromo P-450, donde se obtienen 4 metabolitos; de estos, el metabolito que ejerce mayor daño citotóxico y genotóxico es la mostaza fosforamida.^{18,19,24}

Al evaluar ratones y ratas adultas en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea, se obtuvieron menores tasas de daño que en fetos,^{9,20,21} pudiéndose utilizar mejor los fetos o neonatos en ambas especies para realizar evaluaciones genotóxicas, pues estos son mucho más sensibles a las sustancias que dañan al ADN, lo cual resultaría interesante evaluar el efecto espontáneo e inducido de neonatos con el fin de lograr un biomodelo más sensible que los existentes.

Los fetos de ratas SD demostraron tener menores índices de citotoxicidad y genotoxicidad, cuyos resultados más bajos se obtuvieron de micronúcleos endógenos. Los mejores resultados de inducción de citotoxicidad y genotoxicidad por la alta formación de micronúcleos con CF fueron en fetos de ratas SD, los que resultaron más susceptibles al daño genotóxico logrado con el mutágeno. Se corroboró el poder clastogénico transplacentario de la CF vinculando una vez más este ensayo de genotoxicidad a toxicología de la reproducción. Estos resultados sugieren el mejor uso de fetos de ratas SD como biomodelo en este ensayo cuando es utilizada la CF como control positivo por la vía y dosis estudiada; además se pudieran utilizar en la evaluación de nuevas drogas con carácter antígenotóxico por vía transplacentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, et al. *In vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.* 1994;312(2):293-304.
2. Organisation 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 OCDE TG 475. Paris: OECD Publishing; 1997. p. 5-6.
3. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel.* 2009;25(3):22-38.
4. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res.* 1975;31:9-15.
5. Gollapudi B, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.* 2000;354(2):97-9.
6. Gámez R, Fernández I, Acosta PC, Alemán C, Rodeiro I, Rodríguez M. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev CENIC.* 2000;31(3):211-6.
7. Porter A, Singh G. Trasplacentar teratogenesis and mutagenesis in mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesi.* 1988;8(4):191-203.
8. 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 Toxicol.* 2001;1(1):35-9.
9. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. 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.* 2009;24(2):7-29.
10. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Evaluación y comparación de cuatro líneas de ratones como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad. *Biocyt.* 2011;4(14):240-6.
11. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Evaluación y comparación de tres líneas de ratas como biomodelos en ensayos de genotoxicidad. *Animales de Laboratorios.* 2011;51(3):57-65.
12. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Carta al Editor: Evaluación y comparación entre tres líneas de ratas como biomodelos en cuatro ensayos de genotoxicidad. *Retel.* 2011;35(2):16-24.
13. Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.). Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Psychology. Ottawa: Bradda Printing Services Inc; 1997. p. 155-62.
14. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE. Ensayo de micronúcleos transplacentarios en roedores, una buena opción en toxicología experimental. *Retel.* 2010;33(4):33-41.

15. Adler ID, 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. *Mutation Res.* 1998;417:19-30.
16. Matuo R, Oliveira RJ, Silva AF, Mantovani MS, Ribeiro LR. Anticlastogenic Activity of Aqueous Extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing Cells (HTCs) During Cell Cycle. *Toxic Mechan Meth.* 2007;17(3):147-52.
17. Meintieres S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure for the apoptosis. *Envir Mol Mut.* 2003;41:260-9.
18. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl.* 2002;4:201-7.
19. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei H, Rezvanfar MA. 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.
20. Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor.* 2011;20(1):28-33.
21. Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Vet Argent.* 2010;27(264):1-13.
22. 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.
23. 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.
24. Arencibia DF, Rosario LA. 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.

Recibido: 24 de octubre de 2011.

Aprobado: 25 de noviembre de 2011.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 16017. La Habana, Cuba. Correo electrónico: darencibia@finlay.edu.cu
