

Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de aberraciones cromosómicas en ratones Balb/c

Genotoxic assessment of the *Carapa guianensis* Aublet seed oil extract in the chromosomal aberrations assay performed in Balb/c mice

MSc. Daniel Francisco Arencibia Arrebola,^I MSc. Luis Alfredo Rosario Fernández,^{II} MSc. Livan Delgado Roche,^{III} Lic. Adriana Alonso Laurencio,^{II} Dr. C. Juan Francisco Infante Bourzac,^I Dr. C. Alexis Vidal Novoa^{IV}

^I Instituto Finlay. La Habana, Cuba.

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

^{III} Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB). La Habana, Cuba.

^{IV} Facultad de Biología. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet ha tenido diversos usos biomédicos. Recientemente fue evaluado este extracto, el cual manifestó grandes potencialidades como antioxidante en ensayos *in vivo*; pero poco se conoce de su efecto sobre el ADN en biomodelos experimentales.

Objetivo: evaluar el potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* en el ensayo de aberraciones cromosómicas de células de la médula ósea de ratones Balb/c.

Métodos: se formaron cinco grupos experimentales: un grupo placebo (Tween 65 al 2 %), tres tratados con niveles de dosis del extracto (400, 1 000 y 2 000 mg/kg), administrados por vía oral durante 14 días; por último, un grupo control positivo tratado con ciclofosfamida, en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal 48 y 24 h antes de la eutanasia. Se administraron cinco animales/sexo/grupo. Después de los 14 días de administración se les efectuó la eutanasia por dislocación cervical y se les extrajo la médula ósea del fémur para proceder a realizar la técnica citogenética de aberraciones cromosómicas.

Resultados: los resultados entre controles y tratados con el extracto no difirieron para los dos sexos en las variables índice mitótico, Gaps, células con poliploidías, número de células con aberraciones cromosómicas y cromatídicas y el porcentaje de células con aberraciones. Sin embargo, sí difirieron controles y tratados contra el grupo tratado con ciclofosfamida, lo que valida nuestros resultados.

Conclusiones: el extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* no posee potencialidades genotóxicas en la formación de aberraciones cromosómicas, sobre todo estructurales en células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Palabras clave: extracto oleoso, *Carapa guianensis*, aberraciones cromosómicas, ratones Balb/c.

ABSTRACT

Introduction: the oil extract from *Carapa guianensis* seed has various biomedical applications. It was recently evaluated and revealed great potentialities as antioxidant in in vivo assays, but little is known about its effect on DNA in experimental biomodels.

Objective: to evaluate the genotoxic potential of the oil extract from *Carapa guianensis* seed in the chromosomal aberration of the bone marrow cells test performed in Balb/c mice.

Methods: five experimental groups were created: one placebo group (Tween 65, 2 %), three treated with different extract doses (400, 1000 and 2000 mg/kg) orally administered for 14 days and one positive control group treated with cyclophosphamide at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally at 48 and 24 h before euthanasia. Five animals per sex from each group were administered the set dose. After 14 days of treatment, the animals were euthanized through cervical dislocation and their femoral bone marrow was taken out to perform the cytogenetic chromosomal aberration technique.

Results: the results between the control group and the groups treated with the extract did not differ between the two sexes in terms of the mitotic index variables, Gaps, polyploidy cells, number of cells with chromosome and chromatic aberrations and the percentage of aberration cells. However, the results of controls and of treated groups were different from those of the group treated with cyclophosphamide, which proved the validation of our results.

Conclusions: the oil extract from *Carapa guianensis* seeds does not have genotoxic potential for the formation of chromosome aberrations, mainly structural, in Balb/c mice bone marrow of both sexes.

Key words: oil extract, *Carapa guianensis*, chromosomes aberrations, Balb/c mice.

INTRODUCCIÓN

Carapa guianensis pertenece a la familia Meliaceae, es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo; en Cuba es conocida como cedro macho.

La caracterización del aceite de la semilla de *Carapa guianensis* ha revelado la presencia de ácidos grasos merístico, palmítico, oleico, linoleico,^{1,2} esteárico y ácido araquidónico.³ Algunos tetraterpenoides han sido aislados de la semilla de *Carapa*

guianensis, nombrados como, 6-alfa-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-deacetoxina-7-oxogedunina, gedunina, andirobina, metil angolensatedina,³ 1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecilico acil-glicérido, ácido hexacosanoico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-dihidroxi metilbenzoato, 2,6-dihidroxi metilbenzoato, ácido tetratriacontanoico, ácido triacontanoico,⁴ epoxiazadiradiona, 6-alfahidroxigedunina.⁵

También se ha observado que los tetraterpenoides obtenido 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.

Recientemente se ha descrito el potencial antioxidante, la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis*.⁶⁻¹⁰ Esta planta abunda en el Caribe especialmente en Belice, Trinidad y Tobago y Cuba.^{6,8,9} Los estudios fotoquímicos de los extractos obtenidos en estas regiones denotan la presencia mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados y de compuestos fenólicos tales como taninos y limonoides.

Una vez que ha sido demostrado su efecto antioxidante mediante la administración oral del extracto durante tres semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, coadministradas con una sustancia oxidante en que se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno,¹⁰ se hace necesaria la evaluación de su nivel de seguridad, al menos en los ensayos de toxicidad clásica de primera y segunda barrera.¹¹

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* en el ensayo de aberraciones cromosómicas de células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 24 ± 2 °C, la humedad entre 55 ± 10 % y los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 horas. El alimento administrado a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio.¹²

Obtención del extracto oleoso

Se agregó N-hexano a razón de 2 kg de semilla de *Carapa guianensis* previamente secado y triturado. Se dejó en reposo por 60 min y luego se filtró al vacío. El solvente se adicionó hasta que la muestra botánica del aceite se saturó y luego fue removido reduciendo presión. El rendimiento del extracto fue del 29 % (v/w). La densidad

aparente del aceite se calculó (0,81 g/mL) y este resultado se utilizó para definir el volumen exacto que cada animal recibió. El aceite se conservó a -20 °C hasta su uso.

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 empleará en el resto de las evaluaciones de toxicología preclínica.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente (cinco ratones/grupo/sexo), cinco grupos experimentales: un grupo control de vehículo (Tween 65, 2 %), tres tratados con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) y un control positivo tratado con ciclofosfamida (N,N-bis (cloruro de etilo)-N', O-esterdiamida del ácido fosfórico propinel) (CF), mutágeno de reconocida potencia validado para este ensayo. Las emulsiones hechas con el extracto y vehículo se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg) durante 14 días, en el horario comprendido de 10:00 a 11:00 a.m. La CF se administró en dos dosis (50 mg/kg) por vía intraperitoneal 48 y 24 h previas a la eutanasia en el horario de 10:00 a 11:00 a.m., según se establece para el ensayo.^{13,14}

La dosis menor del extracto ha sido empleada en estudios farmacológicos preclínicos,^{3,7,15,16} la cual ha demostrado ser efectiva en los modelos contra Leishmania, cáncer de útero y como antioxidante y dos niveles superiores múltiples de este (1 000 y 2 000 mg/kg).^{15,16}

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el de 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 aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea

En el horario de la mañana (4 h antes de la eutanasia), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (4 mg/kg, vía i.p.).^{13,14} 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. 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 tres 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.^{13,14} Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones (rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos) y frecuencia de gaps. También se calculó el índice mitótico IM % (porcentaje de metafases en 1 000 células leíbles), el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles, y el porcentaje de células totales con aberraciones. Todas las

determinaciones fueron leídas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.^{13,14}

Eutanasia

A todos los animales se les practicó la eutanasia por dislocación cervical teniendo en cuenta el tiempo de exposición a cada una de las sustancias evaluadas.¹⁷

Procedimientos éticos

Los autores declaramos que este trabajo fue confeccionado 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. Además se declara por parte de los autores del artículo que al comenzar esta investigación se obtuvo por escrito el consentimiento de aprobación del protocolo e informe por el comité institucional de ética para la experimentación animal de nuestras instituciones.

Análisis estadístico

La variable IM y el porcentaje de células totales con aberraciones se analizaron siguiendo el algoritmo para pruebas de comparaciones múltiples. Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza de ambas variables continuas, los resultados están distribuidos normalmente (normalidad, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov), existiendo dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por lo cual se analizó con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha = 0,05$.^{13,14} En caso de diferir los resultados entre grupos experimentales con la prueba de ANOVA se procedió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para $\alpha = 0,05$. Las variables categóricas, número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y el número de células con poliploidía, se analizaron mediante la prueba de χ^2 , el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0,01$.^{13,14} Todas las comparaciones se efectuaron contra el grupo control negativo (Tween 65, 2 %), teniendo en cuenta los dos tipos de variables analizadas (continuas y categóricas). Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

Los resultados de la evaluación del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el ensayo de aberraciones cromosómicas se presentan en la tabla.

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 tratados con la CF si se observó un aumento considerable de aberraciones cromosómicas de ambos tipos, resultados estos que difirieron con el grupo control y los tratados por vía oral con el extracto.

Tabla. 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

Tratamiento	IM (%) ^a (Media ± DE)	Células con poliploidía ^b	Gaps ^b	Aberraciones/ 1 000 células/grupo ^b	# CTA ^b	% CA ^a			
Cromosómicas				Cromatídicas					
Rupturas		Intercambios		Rupturas		Intercambios			
Machos									
CN	5,32 ± 0,44	2	4	0	0	6	1	7	1,40 ± 0,49
CF	3,10 ± 0,24*	18**	36**	5**	19**	130**	26**	180*	36,00 ± 3,74*
ECG (400 mg/kg)	5,47 ± 0,35	1	5	0	0	8	1	9	1,80 ± 0,40
ECG (1 000 mg/kg)	5,25 ± 0,47	2	7	0	0	5	1	6	1,20 ± 0,40
ECG (2 000 mg/kg)	5,21 ± 0,51	1	3	0	0	7	1	8	1,60 ± 0,49
Hembras									
CN	5,16 ± 0,37	1	2	0	0	8	1	9	1,80 ± 0,40
CF	3,02 ± 0,29*	15**	41**	3**	20**	123**	23**	169*	33,80 ± 2,64*
ECG (400 mg/kg)	5,08 ± 0,42	2	3	0	0	9	1	10	2,00 ± 0,63
ECG (1 000 mg/kg)	5,11 ± 0,50	1	4	0	0	7	2	9	1,80 ± 0,75
ECG (2 000 mg/kg)	5,19 ± 0,18	1	4	0	0	6	2	8	1,60 ± 0,49

^a Media ± DE, 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).

El número de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales en los grupos tratados con el extracto coinciden con los resultados espontáneos informados para esta especie y línea en particular teniendo en cuenta el mismo sexo. Además el porcentaje de células con aberraciones también coincide con el informado para esta especie y línea en particular en los animales tratados con las diferentes dosis del extracto.

DISCUSIÓN

Los resultados que se aprecian en la tabla 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.

Los valores del IM se mantuvieron de forma similar entre tratados con el extracto y controles negativos, lo cual demuestra que a altas dosis (2 000 mg/kg) y administrado de forma reiterada el extracto no interfiere en la división celular, pues no modifica los valores de IM espontáneos en la especie de ratón utilizada en este experimento.¹⁸ En este índice tampoco hubo diferencias entre sexos, por lo que no hay sexo dependencia en cuanto a las bajas potencialidades del extracto de ser citotóxico.¹⁹ Analizando los resultados en los animales tratados con la CF se observa que difirieron significativamente al compararlos contra controles y tratados, esta droga administrada 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 control positivo ha sido ampliamente evaluado en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad.¹⁸⁻²⁰ 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.^{21,22} Estos agentes poseen grupos químicos en su estructura que tienen la propiedad de unirse en forma covalente con elementos nucleofílicos de las células, remplazando un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en la molécula del ADN. Generalmente en el nitrógeno 7 de la guanina.^{21,22}

La mayoría de los agentes alquilantes como la CF se consideran bifuncionales debido a que poseen dos radicales activos que reaccionan con grupos intracadena formando puentes con el filamento molecular helicoidal que determinan la muerte celular.²¹ 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.²³⁻²⁵ 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.²³⁻²⁵ Se trata de que las células analizadas confluyan todas en una fase puntual de la división celular, en el caso de este estudio fue en metafase.^{26,27}

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

El número de células con poliploidía tampoco difirió entre tratados con el extracto y controles negativos. Estos valores se mantuvieron similares y concuerdan con los informados para esta especie y línea evaluada en ambos sexos.¹⁸ De igual forma al IM (%), la CF aumentó la aparición de esta aberración cromosómica de tipo numérica, estando aumentado alrededor de 10 veces su valor espontáneo.^{18,28} Los

valores encontrados con el uso de la CF como control positivo se encuentran dentro de los informados para este mutágeno al utilizarse a la misma dosis ensayada.¹⁸ Hemos de resaltar que este tipo de ensayo fue diseñado solo para detectar aberraciones de tipo estructural,¹⁴ pero como hemos visto en numerosas investigaciones se establecen índices de aberraciones de tipo numérica como las aquí evaluadas en respuesta a variables citotóxicas del sistema a prueba que no resultan de interés genotóxico, aunque por mecanismos similares pudieran tener un valor importante en la aparición de daño al ADN por mecanismos genotóxicos indirectos.^{13,14,26,27}

Al evaluar el número de células con aberraciones estructurales de tipo Gaps se encontraron valores similares entre controles y tratados con el extracto en ambos sexos. Cabe destacar que aunque los valores entre sexos no difirieron en los grupos tratados con el extracto, en el grupo control negativo si se obtuvo un menor número de aparición de aberraciones tipo Gaps en los ratones del sexo hembra, lo cual está acorde con lo descrito en la literatura,¹⁷ además concuerda con lo reportado para esta línea de ratón¹⁸ y para animales tratados con Tween 65 (2 %) como control solvente durante 14 días por vía oral.¹⁸

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, y como era de esperar los resultados no difirieron entre sexos pero se observó un marcado aumento de esta aberración en las hembras.^{18,28}

El porcentaje de células con aberraciones en los grupos tratados con el extracto estuvo entre 1,20-2,00, similar al obtenido en los tratados con el solvente, resultados que no difieren entre ellos para ambos sexos. Además coinciden con el porcentaje de células con aberraciones informado para este especie.^{27,29-31}

Por su parte, el número de células con aberraciones fue similar entre tratados con el extracto y controles negativos. Además, los resultados en los grupos tratados estuvieron dentro del rango informado para esta especie,¹⁸ con valores entre 0-5 % de células con aberraciones de forma espontánea.^{27,29-31}

En los animales tratados con el extracto no se observó la aparición de aberraciones de tipo cromosómicas, 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,³⁰ trabajos con resultados similares así lo demuestran.^{18,19,28,31} Estos resultados son producto a que este tipo de aberración aparece a partir de la segunda mitosis postratamiento y cuando el producto a evaluar posee efecto genotóxico potencial. Como es el caso del grupo tratado con la CF en el que los valores encontrados de aberraciones cromosómicas difieren contra controles y tratados, tanto en las de tipo rupturas como intercambios. Estos valores están acorde con los informados por este mutágeno al ser administrado por vía i.p. en dosis de 50 mg/kg en dos ocasiones, en la línea de ratón evaluada.^{18,19}

No se observaron diferencias significativas entre controles y tratados con el extracto al tener en cuenta el número de células con aberraciones cromatídicas, además el número informado en estos grupos fue similar a los valores espontáneos de la línea de ratón utilizada.¹⁸ La mayoría de las aberraciones cromosómicas observadas en este estudio, en particular en los animales tratados con CF, son las de tipo cromatídico, lo que se encuentra condicionado por el hecho de que la primera mitosis celular postratamiento es la fase más sensible para la acción de los mutágenos potenciales^{30,32} y corrobora que en nuestras condiciones de trabajo el comportamiento del modelo fue adecuado.

Es importante comentar que la ausencia de efecto mutagénico y citotóxico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* observado en este estudio no se relaciona con una inadecuada exposición a la sustancia ensayo, ya que las dosis por vías orales de este producto entre 100 y 350 mg/kg, inferiores a las utilizadas en el presente estudio, han producido efectos farmacológicos importantes.^{6-10,15,16}

Además se utilizó la dosis máxima recomendada (2 000 mg/kg) para este ensayo tanto en esquemas de dosis única como repetidas durante 14 días.^{14,33} Esta dosis se recomienda para los ensayos de dosis únicas en que la toma de muestra se realiza entre las 24 y las 48 h postratamiento ya que el tejido diana, que es la médula ósea, 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.^{30,33} Por tanto, el empleo de esta dosis administrada durante más tiempo descarta que la exposición a la sustancia haya sido insuficiente.

En conclusión, 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 potencial genotóxico ni citotóxico sobre las células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinto GP. Contribuição ao estudo químico do óleo de Andiroba. Boletín Técnico do Instituto Agronómico do Norte. 1956;31:195-206.
2. Teske, M, Trentini AM. Herbarium: Compendio de Fitoterapia. Paraná: Herbarium Laboratorio Botánico; 1997. p. 35.
3. Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. Inflammation Res. 2005;54:295-303.
4. Qi S, Wu D, Zhang S, Luo X. Constituent of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). Pharmazie. 2004;59:488-90.
5. 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. Intern Immunopharmacol. 2006;6:109-21.
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. Alonso A. Evaluación pre-clínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante [tesis]. La Habana: IFAL-UH; 2012. p. 1-58.
11. Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. *Rev CENIC.* 2007;38(3):204-8.
12. 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.
13. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel.* 2009;23(3):23-40.
14. 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.
15. 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. *J Ethnopharmacol.* 2007;112:122-6.
16. 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. *J Ethnopharmacol.* 2008;116:495-500.
17. Shayne CG. Animal Models in toxicology. Chapter 2: The Mouse. Toxicology. Second edition. New York Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007. p. 24-72.
18. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A. Comparación entre líneas de ratones en el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Revista MVZ Córdoba.* 2012;17(2):2957-63.
19. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, et al. Efectos del D-003, mezcla de ácidos alifáticos en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo*. *Rev Cubana Farm.* 2010;44(2):213-20.
20. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE. Sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. *J Basic Appl Genet.* 2011;22(2):125-32.
21. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monografía Medicina Veterinaria. 1999;19(1-2):45-65.

22. Chahoud I, Kuriyama SN, Paumgarten FJ. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyuria in rats. *Toxicology*. 2002;179:137-49.
23. 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.
24. 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.
25. Shah RM, Izadnegahdar MF, Henh BM, Young AV. *In vivo/in vitro* studies on the effects of cyclophosphamide on growth and differentiation of hamster palate. *Anticancer Drugs*. 1996;7:204-12.
26. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Review about assessment of different murine lines as biomodel in genotoxicity assays by means of cytogenetic methods. *Asian J Pharmaceut Biol Res*. 2011;1(4):552-62.
27. 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(2):48-58.
28. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Comparison in the efficiency of different rat lines in the chromosomal aberrations assays. *J Experiment Integr Med*. 2013;3(1):13-17.
29. 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.
30. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays: analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res*. 1999;189:157-65.
31. 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. *Rev CENIC*. 2010;41(Especial):1-7.
32. Ecobichon D. Mutagenesis. The basis of toxicity testing. Boca Ratón, Florida: Mc Gill University, Montreal. De. CRC, INC; 2001. p. 113-36.
33. 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.

Recibido: 4 de marzo de 2013.

Aprobado: 6 de mayo de 2013.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: darencibia@cecmcd.sld.cu