



Revista Internacional de Andrología

www.elsevier.es/andrologia



ORIGINAL

Potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{a,*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^b,
Livan Delgado Roche^c, Adriana Alonso Laurencio^b y Alexis Vidal Novoa^d

^a Instituto Finlay, La Habana, Cuba

^b Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

^c Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB), La Habana, Cuba

^d Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

Recibido el 16 de noviembre de 2012; aceptado el 11 de diciembre de 2012

Disponible en Internet el 18 de abril de 2013

PALABRAS CLAVE

Extracto oleoso;
Carapa guianensis;
Morfología;
Cabeza;
Espermatozoide;
Ratones Balb/c

Resumen

Objetivo: La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar el potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones machos Balb/c.

Materiales y métodos: Se formaron 5 grupos experimentales: un grupo placebo (Tween 65 al 2%), 3 niveles de dosis del extracto (400, 1.000 y 2.000 mg/kg), administrados por vía oral durante 35 días, y por último un grupo control positivo tratado con ciclofosfamida (CF), en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal durante 5 días y 35 días de reposo después de la última administración con el mutágeno. Se distribuyeron 8 animales/grupo. Después de los 35 días de administración se eutanizaron por dislocación cervical y se extrajeron ambos epidídimos para ser procesados y evaluados según esta técnica citogenética.

Resultados y discusión: Los resultados obtenidos entre controles y tratados con el extracto no difirieron en cuanto a la frecuencia de las diferentes anomalías de la cabeza del espermatozoide encontradas, y tampoco en la concentración espermática y de espermatozoides con gota citoplasmática. Sin embargo, sí difirieron controles y tratados contra el grupo tratado con CF, validando nuestros resultados. Se concluye que el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* no posee potencialidades genotóxicas para inducir aumento en la frecuencia espontánea de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones machos Balb/c.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: darencibia@cecmec.sld.cu (D.F. Arencibia Arrebola).

KEYWORDS

Oleaginous extract;
Carapa guianensis;
Morphology;
Head;
Sperm;
Balb/c mice

Genotoxic potencial of the *Carapa guianensis* Aublet seed oleaginous extract to induce abnormalities in sperm head morphology**Abstract**

Objective: This study has aimed to evaluate the genotoxic potential of *Carapa guianensis* seed oil extract to induce sperm head abnormalities in Balb/c mice.

Material and methods: Five experimental groups were formed: one placebo group (Tween 65, 2%), three extract dose levels (400, 1000 and 2000 mg/kg) administered orally for 35 days and one positive control group treated with cyclophosphamide (CP) at a dose of 50 mg/kg via intraperitoneally for 5 consecutive days and then 35 days of rest after the last administration with the mutagen. Were distributed 8 animals per group. The animals were euthanized by cervical dislocation 35 days after the administration and the epididymis was extracted to proceed with the sperm head morphology assay.

Results and discussion: There were no significant differences in the results between the controls and those treated with the extract regarding frequency of the different sperm head anomalies or in the spermatoc concentration and sperms with cytoplasmic drop. However, a difference was found between the controls and treated versus the CP treated group, validating our results. We have concluded that the oleaginous extract of *Carapa guianensis* seeds does not have genotoxic potentialities to induce an increase in the spontaneous frequency in the sperm head morphology of male Balb/c mice.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Carapa guianensis pertenece a la familia *Meliaceae*. Es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo, y 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 araquidónico³. Algunos tetraterpenoides también han sido aislados de la semilla de *Carapa guianensis*³.

También se ha observado que los tetraterpenoides obtenidos de la semilla de *Carapa guianensis* tienen una significativa actividad antialérgica, debida a la inhibición del factor nuclear kB y la supresión de la IL-5 y el CCL11/eotaxina⁴.

Recientemente se han descrito el potencial antioxidante y la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis*⁵⁻⁹. Esta planta abunda en el Caribe, especialmente en Belice, Trinidad y Tobago y Cuba^{6,8,9}. Los estudios fitoquímicos de los extractos obtenidos en estas regiones denotan la presencia mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados y de compuestos fenólicos tales como taninos y limonoides.

Una vez que ha sido demostrado su efecto antioxidante mediante la administración oral del extracto durante 3 semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, co-administradas con una sustancia oxidante donde se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno⁹, se hace necesaria la evaluación de su nivel de seguridad, al menos en los ensayos de toxicidad clásica de primera y segunda barrera¹⁰.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial genotóxico

del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones machos de la línea Balb/c.

Fue utilizada la línea Balb/c basándonos en los resultados de nuestras investigaciones, ya que al ser comparada esta línea con otras en este ensayo resultó ser el mejor biomodelo, experimentando baja frecuencia de anomalías en la cabeza del espermatozoide, alta concentración espermática y respuesta aceptable a clastógenos químicos como la ciclofosfamida (CF)¹¹.

Además existen investigaciones que demuestran que el extracto oleoso obtenido de la semilla de *Carapa guianensis* provoca problemas de infertilidad en dosis repetidas, aunque no han sido investigadas para demostrar su relación directa con la fertilidad del macho¹².

Materiales y 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 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, la humedad entre $55 \pm 10\%$ y los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 h. 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.

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 durante 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). Se calculó la densidad aparente del aceite (0,81 g/ml), y este resultado fue utilizado para definir el volumen exacto que cada animal recibió. El aceite fue conservado 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.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente (8 ratones/grupo) en 5 grupos experimentales: un grupo control de vehículo (Tween 65 al 2%), 3 tratados con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* (400, 1.000 y 2.000 mg/kg) y un control positivo tratado con CF (N,N-bis [cloruro de etilo]-N', O-esterdiamida del ácido fosfórico propinil). Las emulsiones realizadas con el extracto y vehículo se administraron mediante intubación gástrica (2 ml/kg) durante 35 días, en el horario comprendido de 10:00 a 11:00 a.m. La CF se administró 5 días consecutivos (50 mg/kg) por vía intraperitoneal en el horario de 10:00 a 11:00 a.m. y luego estuvieron 35 días sin administrar, según se establece para este ensayo¹³.

La dosis menor del extracto ha sido empleada en estudios farmacológicos preclínicos^{3,6,14,15} y ha demostrado ser efectiva en los modelos contra *Leishmania*, cáncer de útero y como antioxidante, y 2 niveles superiores múltiplos de este (1.000 y 2.000 mg/kg)^{14,15}.

Observaciones clínicas

Se realizaron 2 observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 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 y de posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide

Este ensayo se realizó de acuerdo a las normas de la ICH de 2005 sobre toxicología de la fertilidad del macho^{13,16}. Para realizar este ensayo se procedió a extraer ambos epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos, siendo depositados en placas de Petri que contenían 3 ml de solución isotónica de NaCl al 0,9%¹³. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur¹³.

Recuento de espermatozoides

El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadieron 0,05 ml de tripsina al 0,25%, y transcurridos 5 min de tripsinización se le añadieron 2 ml más de NaCl al 0,9%. Luego se realizó una dilución del homogeneizado tripsinizado en NaCl-formol al 1% (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, conectándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2 a $10\times$ ^{13,16,17}.

Morfología del espermatozoide

Al tubo que contenía la dilución del homogeneizado ya diluido se le añadieron 5 gotas de eosina al 1%, dejándolo reposar durante 5 min. Posteriormente se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto^{13,16,17}. Se prepararon 2 láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides con la ayuda de un microscopio Olympus BH-2 a $40\times$. Las observaciones fueron realizadas «a ciegas» por 2 observadores independientes para luego establecer un promedio entre ambos. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales, que incluyen amorfas, banana, sin gancho y con 2 colas^{13,16,17}. Además se determinó el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática (EGC) como índice de fertilidad, inmadurez celular y citotoxicidad¹⁸.

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 evaluadas¹⁹.

Procedimientos éticos

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, 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

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza. Los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)¹³. Por ello, todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA)^{13,17}. El nivel de significación establecido fue $\alpha=0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico Statsoft for Windows, StatSoft, Inc. (2003), STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados

No hubo muertes durante el estudio ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas

entre grupos tratados y controles en las variables que miden las diferentes anomalías en la cabeza del espermatozoide (variables genotóxicas); sin embargo, en el componente que mide citotoxicidad sí hubo diferencias entre el grupo control negativo y la dosis máxima administrada (2.000 mg/kg) (tabla 1). El porcentaje de EGC se comportó de forma similar entre controles y tratados, sin diferencias significativas entre los promedios de estos.

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

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

Discusión

Los resultados que se aprecian en la tabla 1 demuestran que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 35 días en ratones Balb/c machos mantuvo los índices espontáneos del número de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide. De igual forma, no interfirió en la división celular, aunque la dosis máxima evaluada difirió con el control negativo y con el control positivo, con resultados intermedios en la concentración espermática.

Resultados similares obtuvieron Costa et al.¹² cuando evaluaron el extracto oleoso de esta planta en estudios toxicológicos reproductivos, donde hubo una ligera disminución de la fertilidad en ratas Wistar en la dosis máxima, sin diferir con los controles.

Los resultados obtenidos en la morfología de la cabeza del espermatozoide en los animales tratados con las diferentes dosis del extracto coinciden sin diferir con los reportados para esta especie y línea en particular¹¹.

Además, la concentración espermática obtenida en los grupos tratados con el extracto en las dosis de 400 y 1.000 tampoco difirió con los datos basales reportados para esta especie y línea¹¹. Los resultados de la concentración espermática en el grupo de 2.000 mg/kg, además de diferir con el grupo control negativo y positivo, también difirió con los datos espontáneos de citotoxicidad reportados para esta línea de ratón¹¹.

El hecho de que se hayan reportado diferencias entre los tratados con el extracto y controles negativos contra el grupo tratado con CF valida la conducción de nuestro ensayo, dando mayor confiabilidad a nuestros resultados. Además, estos resultados son consistentes con los reportados para la CF en esta especie y línea, utilizando inclusive otros esquemas de tratamiento^{11,20,21}.

El D-004, un extracto con similar composición en ácidos grasos, tampoco modificó la concentración espermática

Tabla 1 Efecto del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones machos Balb/c

Grupo	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin gancho	Dos colas	% EGC	Concentración* (10 ⁶ células/ml)
CN	488,98 ± 4,36 ^a	11,02 ± 4,36 ^a	7,11 ± 6,03 ^a	1,42 ± 1,00 ^a	2,09 ± 2,01 ^a	0,40 ± 1,26 ^a	3,68 ± 1,57 ^a	2,31 ± 0,25 ^a
CF	399,93 ± 10,28 [*]	100,07 ± 4,40 [*]	36,08 ± 8,21 [*]	24,77 ± 2,66 [*]	31,23 ± 4,37 [*]	7,99 ± 1,86 [*]	25,48 ± 6,84 [*]	0,82 ± 0,16 [*]
ECG 400 mg/kg	488,31 ± 3,81 ^a	11,69 ± 3,81 ^a	8,33 ± 3,88 ^a	1,00 ± 0,94 ^a	2,00 ± 1,93 ^a	0,36 ± 1,04 ^a	3,99 ± 1,11 ^a	2,10 ± 0,20 ^a
ECG 1.000 mg/kg	486,12 ± 5,72 ^a	13,88 ± 2,72 ^a	9,57 ± 4,10 ^a	1,63 ± 1,21 ^a	2,20 ± 2,12 ^a	0,48 ± 1,33 ^a	3,81 ± 1,49 ^a	1,88 ± 0,29 ^a
ECG 2.000 mg/kg	485,81 ± 2,90 ^a	14,19 ± 2,90 ^a	9,89 ± 5,21 ^a	1,70 ± 1,27 ^a	2,06 ± 2,05 ^a	0,54 ± 1,20 ^a	3,71 ± 1,05 ^a	1,41 ± 0,21 ^a

Determinaciones en 500 células/animal.

CF: control positivo, ciclofosfamida 50 mg/kg por vía i.p. durante 5 días consecutivos; CN: control negativo; EGC: extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 35 días); EGC: espermatozoides con gota citoplasmática.

^a Difiere contra el control positivo (CF) con el mismo análisis estadístico (X: media; DE: desviación estándar).

* p < 0,05 (comparación con el control negativo, ANOVA).

ni la frecuencia en las morfoanomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones OF-1 tratados por vía oral con dosis máximas del extracto oleoso de *Roystonea regia* de 1.500 mg/kg²². Además, estos resultados fueron consistentes al evaluarse en ratas SD en dosis de 2.000 mg/kg utilizando este mismo ensayo²³.

Los resultados de genotoxicidad obtenidos en este ensayo concuerdan con los reportados en el ensayo de micronúcleos en este mismo extracto, donde dosis de 2.000 mg/kg no modificaron la formación espontánea de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea²⁴, sin clasificar como genotóxico este ensayo ni el biomodelo utilizado²⁴. Sin embargo, hubo una disminución, aunque no significativa, al compararse con los controles en el indicador eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos, índice que mide el componente citotóxico de este ensayo en los ratones macho²⁴.

El porcentaje de EGC no se modificó, y se demostró que tiene un gran componente oxidativo como indicador de fertilidad por la formación de especies reactivas del oxígeno. Este hallazgo morfológico está relacionado directamente con la aparición de infertilidad, inmadurez celular y citotoxicidad. El hecho de que el extracto no haya aumentado y además haya mantenido la frecuencia espontánea de aparición de EGC en la línea de ratón utilizada concuerda con las propiedades antioxidantes ya reportadas con anterioridad, al ser rico en ácidos grasos y terpenoides⁹.

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 vía oral de este producto entre 100 y 350 mg/kg, inferiores a las utilizadas en el presente estudio, han producido efectos farmacológicos importantes^{3-6,9,12}.

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 35 días no posee potencialidades genotóxicas para inducir aumento en la frecuencia espontánea de la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones machos Balb/c.

Responsabilidades éticas

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Financiación

Esta investigación obtuvo financiación del Instituto Finlay y del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Pinto GP. Contribuição ao estudo químico do óleo de Andiroba, 31. Boletín Técnico do Instituto Agronómico do Norte; 1956:195-206.
2. Teske M, Trentini AM. Herbarium: Compendio de Fitoterapia. Paraná: Herbarium Laboratorio Botánico; 1997:35.
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 allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res*. 2005;54:295-303.
4. 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. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:109-21.
5. Ambrozini 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;17:542-7.
6. 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;17:626-30.
7. 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 Bras*. 2009;44:8-14.
8. Tonini H, Arco M. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. *Pesq Agropec Bras*. 2005;40:633-8.
9. Alonso A. Evaluación pre-clínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante [tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos]. La Habana, Cuba: IFAL-Universidad de La Habana; 2012:1-58.
10. Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. *Revista CENIC*. 2007;38:204-8.
11. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE. Comparación entre líneas de ratones como biomodelos en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *Rev Int Androl*. 2011;9:103-8.
12. Costa JH, Lyra M, Lima CR, Arruda VM, Araújo AV, Ribeiro A, et al. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em ratas Wistar. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2006;25:425-8.
13. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*. 2009;25:22-38.
14. 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.
15. 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.
16. ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised tripartite guideline detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility

- S5(R2). Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA; 2005. p. 1-21.
17. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection. United Kingdom, England: UK Published Edition; 1978. p. 135-6.
 18. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Soroa Y. Protocolo de ensayo cometa a partir de espermatozoides de epidídimos de roedores. Retel. 2010;29:38-50.
 19. Shayne CG. Animal models in toxicology. Chapter 2: The mouse. En: Toxicology. 2nd ed. New York, USA: Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007. p. 24-72.
 20. 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: 148-58.
 21. Arencibia DF, Rosario LA. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. REDVET. 2011;12:1-13.
 22. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, et al. Evaluación genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. Rev CENIC Cien Biol. 2009;40:29-32.
 23. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, et al. Evaluación genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*. Revista de Toxicología. 2009;26:127-30.
 24. Arencibia DF, Rosario LA, Delgado L, Alonso A, Suárez YE, Vidal A. Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de micronúcleos en ratones Balb/c. Retel. 2012;39:1-13.