

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación del potencial mutagénico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de Ames por incorporación directa en placas.

Diplom. Jessica Narciandi Lorenzo¹, Lic. Luis Alfredo Rosario Fernández, MSc¹; Lic. Dayisell Lazara Curveco Sánchez²; Lic. Alexis Vidal Novoa, Dr.C³; Dr. MVZ Daniel Francisco Arencibia Arrebola, MSc^{2*}.

¹. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, UH), Habana, Cuba.

². Instituto Finlay, Habana, Cuba.

³. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Habana, Cuba.

* Autor de correspondencia: darrebola@finlay.edu.cu

Resumen

El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* ha tenido diversos usos biomédicos. Recientemente fue evaluado este extracto manifestando grandes potencialidades como antioxidante en ensayos *in vivo*. Pero poco se conoce de su efecto sobre el ADN. La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar el potencial mutagénico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de Ames por incorporación directa en placas. Se utilizaron las cepas TA 1535, TA 98 y TA 100 de *Salmonella typhimurium*. El ensayo se realizó tanto con la adición de la fracción microsomal hepática (S9) como sin ella. Como controles positivos en este ensayo se emplearon dos mutágenos, uno directo: la azida de sodio (AzNa) y uno indirecto: el 2-acetil amino fluoreno (2-AAF). Las concentraciones del extracto empleadas fueron 5, 50, 500, 2 000 y 5 000 µg/placa, utilizando el vehículo Tween 65 (0,2 %) como control negativo. Los resultados mostraron que el extracto oleoso de *Carapa guianensis* no aumento significativamente la frecuencia de reversión respecto al control negativo para ambas variantes del ensayo de Ames, con o sin activación metabólica, en las cepas empleadas. Sin embargo los controles positivos AzNa y 2-AAF incrementaron significativamente el número de colonias revertantes con respecto al control negativo. Se concluye que el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet al ser evaluado en la prueba de Ames por incorporación directa en placa no provoca el aumento de mutaciones puntuales en las cepas TA 98, 100 y 1535.

Palabras claves: Prueba de Ames, extracto oleoso, *Carapa guianensis*, mutagénesis.

Abstract

Assessment of mutagenic potential of the *Carapa guianensis* Aublet seed oil extract in the Ames test for plate incorporation method

The seed oil extract of *Carapa Guianensis* has been various biomedical uses. Recently this extract was evaluated manifesting great potentialities like antioxidant in *in vivo* assays. But not much is acquainted of its effect on DNA. The goal of this research was evaluated the mutagenic potential of the seed oily extract of *Carapa Guianensis* Aublet by means of Ames test for direct incorporation in plates. TA1535, TA 98 and TA 100 strains of *Salmonella typhimurium* were used. The assay was performed with and without addition of the microsomal hepatic fraction (S9). Two mutagens were used as positive controls, one of them direct: the sodium azide (AzNa), and the other one indirect: the 2 acetyl amine fluorene (2 AAF). Concentrations of 5, 50, 500, 2 000 and 5 000 µg/plate of the extract were used. The Tween 65 vehicle (0.2%) was used as negative control. Results showed that the oil extract of *Carapa Guianensis* did not increase significantly the frequency of reversion in relation to the negative control for both variants of the Ames test, with and without metabolic activation, in the strains used. However, the positive controls AzNa and 2 AAF significantly increased the frequency of revertants compared with the negative control. In conclusion, the seed oil extract of *Carapa Guianensis* Aublet evaluated through Ames test by direct incorporation in plates did not increase of mutations in TA 98, TA 100 and TA 1535 strains.

Key words: Ames test, oil extract, *Carapa guianensis*, mutagenesis.

Introducción

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno (Angerer y col., 2007). 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 (Azqueta y col., 2009). Tercero, el origen ambiental del cáncer (Azqueta y col., 2009).

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad (Lamadrid y col., 2011). La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo/beneficio los declare indeseables para la sociedad (Lamadrid y col., 2011).

Los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando se llevaron a cabo todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías de administración de manera independiente (Giri y col., 2002). Con estos estudios se explora el riesgo asociado a daños directos o indirectos sobre el material genético, donde una respuesta positiva deroga por lo general el paso del producto a un segundo nivel de evaluación (Giri y col., 2002).

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 (Pinto, 1956; Teske y Trentini, 1997), esteárico y ácido araquidónico (Penido y col., 2006). 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 (Penido y col., 2006), 1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecilico acil-glicérido, ácido hexacosanoico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-dihroximetilbenzoato, 2,6-dihroximetilbenzoato, ácido

tetratriacontanoico, ácido triacontanoico (Ambrozin y col., 2006), epoxiazadiradiona, 6-alfahidroxigedunina (Ferrari y col., 2007).

También se ha observado que los tetraterpenoides obtenidos 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 (Penido y col., 2006).

Recientemente se ha descrito el potencial antioxidante, la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis* (Tonini y Arco, 2005; Gonçalves y col., 2009; Alonso y col., 2012).

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, co-administradas con una sustancia oxidante donde se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno (Alonso y col., 2012), se hace necesaria la evaluación de su nivel de seguridad, al menos en los ensayos de toxicidad clásica de primera y segunda barrera (Gámez y Más., 2007).

Siendo objetivo de nuestro trabajo evaluar el potencial mutagénico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de Ames por incorporación directa en placas.

Materiales y métodos

Cepas

Se utilizaron las cepas TA 1535, TA 98 y TA 100 todas auxótrofas para la histidina. Las TA 1535 y TA 100 registran mutaciones génicas del tipo sustitución de pares de bases y la TA 98 registra lesiones por corrimiento del marco de lectura. El genotipo de estas cepas fue confirmado mediante la realización de pruebas fenotípicas para los cuatro marcadores principales: carácter his-, mutación rfa de la pared bacteriana, sensibilidad a la luz UV por la mutación uvrB- y el factor R para la resistencia a Ampicillin (en el caso de la TA 98 y la TA 100).

Fracción microsomal hepática

La fracción microsomal hepática (S9) se obtuvo a partir de la metodología descrita en Invitox Protocol, 199016 y almacenada a -70 °C hasta su empleo, momento en el cual se le realizó determinación de proteínas totales para determinar si estaban aptas para ser empleadas.

Ensayo de Ames

El extracto oleoso fue preparado en forma de emulsión usando como agente tensoactivo Tween 65 (0,2%). La preparación de las emulsiones se realizó 1 h antes de la realización de la experiencia. Como controles positivos se emplearon dos mutágenos de reconocida acción en este modelo, la azida de sodio (AzNa) y el 2-acetil amino fluoreno (2-AAF), este último un mutágeno indirecto que permite corroborar la capacidad metabólica de la mezcla S9 empleada en este ensayo. Cada cepa fue cultivada en medio nutriente rico (sin agar): 0,5 % de peptona, 0,3 % de Lab Lemco-Power (Oxoid) y 0,5 % de NaCl. (Fluka), durante 16 horas a 37 °C, con agitación (210 r/min.). Al final de la incubación las bacterias fueron sembradas en medio Vogel Bonner E con glucosa al 2 %.

Incorporación en placa con la adición del homogenato de hígado (S9) (Ames y col., 1973; Invitox, 1990):

Las concentraciones del extracto empleadas se alcanzaron adicionando 200µL de cada dilución en 2 mL de agar suave inoculado con 100µL de cepa para alcanzar 5, 50, 500, 2 000 y 5 000 µg/placa según lo recomendado para este tipo de estudio (Maron y Ames, 1983; Invitox, 1990), utilizando Tween 65 (0,2 %) como solvente control, además de realizar un control sin adicionar el vehículo. Esta suspensión fue vertida en tubos de ensayos que contenían top agar con trazas de histidina-biotina, a las cuales se les había inoculado la cepa y 500 µL de la mezcla S9 o el tampón, para posteriormente verter el contenido total de los tubos sobre las placas de medio selectivo. Posteriormente, se

realizó la incubación por 48-72 h para el registro de la reversión a la prototrofia por conteo de colonias.

Análisis estadístico

Se reportan la media de 6 placas por punto dos series experimentales independientes. Todos los datos se analizaron con una prueba no paramétrica para dos muestras (Wilcoxon), prefijando una $p < 0,01$. Se utilizó como criterio de positividad el incremento en al menos el doble de los valores de la frecuencia de reversión de los controles tratados con el vehículo, una respuesta dependiente de la dosis y diferencias significativas marcadas al comparar contra en grupo control ($p < 0,01$) (Invitox, 1990; Mitchell, 1991).

Resultados y Discusión

Antes de ser utilizadas las cepas de Ames con el producto a evaluar se tuvo en cuenta que mantuvieran los marcadores fenotípicos. La frecuencia espontánea de reversión de las cepas utilizadas coincidieron con los valores promedios reportados para las cepas TA 98, 100 y 1535 (Ames y col., 1973; 1975; Zeiger y col., 1992). De igual forma se comportó el indicador fenotípico mutación *his* el cual coincidió en las tres cepas evaluadas con los valores de referencia reportados por Ames y col., (1973) y con un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en el 2009, donde se evaluó la pérdida de los marcadores fenotípicos en la cepas TA 98, 100 y 102 al ser conservadas bajo diferentes métodos de conservación que incluyó congelación a -80 °C y liofilización con conservación a 4 °C (Arencibia y Rosario, 2009).

La mutación *rfa* de la pared bacteriana, sensibilidad a la luz UV por la mutación *uvrB*- y el factor R para la resistencia a Ampicillin fueron determinados (en el caso de la TA 98 y la TA 100) y estuvieron acorde a los resultados espontáneos reportados para este tipo de cepas (Ames y col., 1973; 1975; Zeiger y col., 1992).

El ensayo de Ames constituye la prueba más difundida y requerida, en los laboratorios de investigaciones toxicológicas y las agencias regulatorias respectivamente, todo el procedimiento se hizo de acuerdo a los que esta descrito por (Maron y Ames, 1983; OECD, 1997), bajo estrictas normas de bioseguridad y esterilidad. Todas las placas registraron crecimiento bacteriano y no hubo mayores problemas técnicos durante la ejecución de este trabajo.

Los resultados del estudio del potencial mutagénico mediante el ensayo de Ames por incorporación directa en placa del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet, se muestran en las Tabla 1 y 2.

Para determinar la actividad mutagénica del extracto se emplearon cepas TA 1535 y TA 100 que detectan mutaciones del tipo sustitución de pares de bases y la TA 98 lesiones por corrimiento del marco de lectura. Los resultados fueron obtenidos luego de 48-72 h de incubación por conteo de colonias. Las colonias obtenidas eran amarillentas, redondas, del tamaño de una cabeza de alfiler, bien delimitadas, y no hubo crecimiento bacteriano de otro tipo, pues las colonias resultaron homogéneas.

Los valores sin la adición de S9 de la cepa TA 1535 estuvieron entre 10,17-12,16, la cepa TA 98 entre 17,11-24,42, la cepa TA 100 entre 90,69-94,88. Teniendo en cuenta la adición de S9 los resultados fueron para la cepa TA 1535 entre 12,94-15,55, la cepa TA 98 entre 30,03-35,12 y la cepa TA 100 entre 98,90- 105,17.

Los resultados obtenidos no arrojaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo para cada cepa ni con los tratados a los diferentes niveles ensayados, tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica lo que demuestra que este producto no se comporta como citotóxico, ni mutagénico en este

modelo experimental, no induciendo mutaciones puntuales. Valores similares obtuvieron Gutiérrez y col., (2005); Rodeiro y col., (2006), al evaluar en este mismo ensayo el potencial mutagénico de extractos acuosos y oleosos de productos naturales ricos en polifenoles, terpenoides y ácidos grasos poliinsaturados, lo cuales clasificaron como no mutagénicos mediante este sistema con activación y sin activación metabólica. Siendo los posibles responsables de la ausencia de mutagenicidad de este extracto los terpenoides y ácidos grasos poliinsaturados ya identificados en la mezcla.

El hecho de que el producto evaluado no haya sido mutagénico con y sin S9 indica que tanto la mezcla como los metabolitos activos creados una vez incorporado el producto a la placa no constituyen sustancias mutagénicas de forma directa e indirecta. De igual forma se debe recalcar la posible posterior evaluación del producto en este mismo ensayo pero en la variante de preincubación, se demostró que esta variante hace aun más sensible este modelo para la mayor identificación de mutágenos obtenidos a partir de compuestos naturales (Gámez y col., 2001; Gutiérrez y col., 2005; Rodeiro y col., 2006).

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas en cuanto al número de colonias revertantes inducida por los mutágenos de referencia con respecto a la frecuencia de revertantes observadas por los controles. Además permitió validar la sensibilidad de la cepa (Maron y Ames, 1983). Es conocido que la azida de sodio es un mutágeno directo con un adecuado uso en ensayos de mutagénesis y genotoxicidad *in vitro* (Zeiger y col., 1992), sobre todo en este ensayo. Dentro de sus efectos mutagénicos fundamentales se destaca el aumento significativo de mutaciones del tipo de sustitución de pares de bases, el hecho de haber escogido este tipo de mutágeno en la variante sin adición de S9 y según los resultados obtenidos hace que sean confiables los resultados del modelo empleado. En tanto el 2 acetil amino fluoreno se utilizó con adición de S9 ya que sus metabolitos secundarios son los responsables de su alto poder mutagénico al ADN (Zeiger y col., 1992).

Los resultados de genotoxicidad obtenidos en este ensayo concuerdan con los reportados en el ensayo de micronúcleos con el uso de este mismo extracto (Arencibia y col., 2012), donde dosis de 2 000 mg/kg no modificaron la formación espontánea de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea (Arencibia y col., 2012a), sin clasificar como genotóxico en este ensayo ni el biomodelo utilizado. Sin embargo, hubo una disminución, aunque no significativa (Arencibia y col., 2012), al compararse con los controles en el indicador eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos, índice que mide el componente citotóxico de este ensayo en los ratones machos (Arencibia y col., 2012).

De igual forma el extracto evaluado no modifico los índices espontáneos de aberraciones cromosómicas en ratones Balb/c de ambos sexos (Arencibia y col., 2013) y

tampoco aumento la frecuencia de anomalías en la cabeza del espermatozoides de ratones Balb/c machos (Arencibia y col., 2013a).

Al ser evaluado en el ensayo cometa de linfocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley administradas durante 14 días por vía oral en dosis de 2 000 mg/kg, el extracto tampoco fue genotóxico a nivel de la estructura primaria del ADN (Arencibia y col., 2013b), ya que se mantuvieron los índices espontáneos de formación de sitios lábiles al álcalis y las rupturas de simple cadena (Arencibia y col., 2013b).

Se concluye que el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet al ser evaluado en la prueba de Ames por incorporación directa en placa no provoca el aumento de mutaciones puntuales en las cepas TA 98, 100 y 1535.

Tabla 1. Potencial mutagénico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet en las cepas TA 1535, TA 98 y TA 100 de *S. typhimurium* en ausencia de (- S9) de la mezcla microsomal hepática.

Grupo	Dosis (µg/placa)	TA 1535	TA 98	TA 100
A	5 000	11,21	17,11	94,88
B	2 000	12,16	21,07	91,85
C	500	10,32	24,42	92,42
D	50	10,17	22,15	90,69
E	5	11,80	20,61	93,44
Control	Tween 2%	13,02	20,30	101,72
Mutágeno	NaAz	461,32*	-	511,24*

Todo el análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de Wilcoxon, $p < 0,01$. *Difiere contra el grupo Control. Control negativo: Tween 2% y control positivo: azida de sodio (NaAz).

Tabla 2. Potencial mutagénico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* Aublet en las cepas TA 1535, TA 98 y TA 100 de *S. typhimurium* en presencia (+S9) de la mezcla microsomal hepática.

Grupo	Dosis (µg/placa)	TA 1535	TA 98	TA 100
A	5 000	15,55	30,03	102,45
B	2 000	13,81	35,12	100,06
C	500	14,12	34,75	105,17
D	50	15,29	32,51	101,33
E	5	12,94	33,50	98,90
Control	Tween 2%	17,60	35,76	106,55
Mutágeno	2AA	-	102,08*	-

Todo el análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de Wilcoxon, $p < 0,01$. *Difiere contra el grupo Control. Control negativo: Tween 2% y control positivo: 2 acetil amino fluoreno (2-AAF).

Referencias

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research* 1975; 31: 347-64.
2. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Nat Acad Sci* 1973; 70(2): 281-5.
3. Arencibia DF, Rosario LA. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. *Retel* 2009; 19(2):19-39.
4. Gámez R, Rodeiro I, Fernández I, Acosta PC. A preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: a mixture of very long chain fatty acids. *Teratog Carcinog Mutag* 2001; 22:175.
5. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el ensayo de Ames por incorporación directa en placa. *Rev CENIC* 2005; 36(supl Especial):1-7.
6. Invittox Protocol. The ERGATT/FRAME data bank of in vitro techniques in toxicology, The Ames test, 30, 1990.
7. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut Res* 1983; 113:173.
8. Mitchell I. Establishment of stochastic significance in Ames test and its relevance to genetical significance. *Mut Res* 1991; 104:269.
9. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Genetic Toxicology: Bacterial Reverse Mutation Test. In: *Guideline for the testing of chemicals. TG 471*. Paris: OECD Publishing; 1997. p. 1-11.
10. Rodeiro I, Cancino L, González JE, Morffi J, Garrido G. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical Tox* 2006; 44: 1707-13.
11. Zeiger E, Andersen B, Howarth S, Timoty L, Mortelmar F. *Salmonella* mutagenicity test: V. Results from the testing of 311 chemical. *Env Molec Mutat* 1992; 21(2):141.
12. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of art. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210:201-28.
13. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res* 2009; 674:101-8.
14. Lamadrid AI, Romero I, González JE, Mandina T. Biomonitoring de trabajadores expuestos a plaguicidas. *Rev Cub Inve Biom* 2011; 30(2):235-44.
15. Giri S, Prasad SB, Giri A, Sharma GD. Genotoxic effects of Malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. *Mutat Res* 2002; 514:223-31.

- 16.**Pinto GP. Contribuicao ao estudo químico do óleo de Andiroba. Boletín Técnico do Instituto Agronómico do Norte 1956; 31:195-206.
- 17.**Teske, M, Trentini AM. Herbarium: Compendio de Fitoterapia. Herbarium Laboratorio Botánico. Paraná; 1997.p.35.
- 18.**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. International Immunopharmacology 2006; 6:109-21.
- 19.**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(3):542-7.
- 20.**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.
- 21.**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.
- 22.**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.
- 23.**Alonso A, Rosario LA, Arencibia DF. 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. IFAL-U.H. Habana, Cuba; 2012.p.1-58.
- 24.**Gómez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. Revista CENIC. 2007; 38(3): 204-8.
- 25.**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):1-13.
- 26.**Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A, Delgado L. Comparison in the efficiency of different murine lines for genotoxicity assays. Interdisciplinary Toxicology 2012a; 5(3):141-9.
- 27.**Arencibia DF, Rosario LA, Delgado L, Alonso A, Infante JF, Vidal A. Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de aberraciones cromosómicas en ratones Balb/c. Revista Cubana de Farmacia 2013; 47(3).
- 28.**Arencibia DF, Rosario LA, Delgado L, Alonso A, Vidal A. Genotoxic potential of the *Carapa guianensis* Aublet seed oleaginous extract to induce anomalies in the sperm head morphology. Revista Internacional de Andrología 2013a; 11(2):54-9.

29. Arencibia DF, Rosario LA, Delgado L, Alonso A, Crespo Y, Biart O, et al. *In vivo* genotoxic potential of the seed oleaginous extract of *Carapa guianensis* Aublet using the comet assay. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2013b; 3(3):231-6.

Recibido: 03/10/13

Aceptado: 09/10/13