

Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa)

Gisela Marrero Cofiño, Ariadne Gutiérrez Martínez, Balía Pardo Acosta, Rafael Gámez Menéndez y Dayisell Curveco Sánchez.

Centro de Productos Naturales (CPN). Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 e/ 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana. Telef: 2714225. Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 24 de agosto de 2006. Aceptado: 6 de febrero de 2007.

Palabras clave: D-004, *Roystonea regia*, ensayo cometa, electroforesis alcalina de células individuales.
Key words: D-004, *Roystonea regia*, comet assay, alkaline single cell gel electrophoresis.

RESUMEN. El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos y ésteres, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes. Los resultados obtenidos han mostrado que en los modelos experimentales el D-004 presenta una eficacia similar, o ligeramente superior, a los extractos de *Saw palmetto* en el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna. En este trabajo se investigó el efecto genotóxico de la administración oral *in vivo* del D-004 en ratones NMRI adultos jóvenes de ambos sexos mediante la aplicación de la electroforesis alcalina de células individuales. Se conformaron cuatro grupos experimentales de cuatro ratones, cada uno de ambos sexos, los cuales se trataron con vehículo o D-004 (500, 1 000 y 2 000 mg/kg) por 14 días. Al finalizar el tratamiento, los leucocitos de los ratones de los diferentes grupos fueron embebidos en agarosa, lisados, sometidos a electroforesis y teñidos con nitrato de plata para analizar la ruptura de cadena (RC) y sitios lábiles al alcali (SLA) en el ADN. En correspondencia con otros estudios genotoxicológicos del producto, atendiendo a la ausencia de genotoxicidad reportada para el mismo en los ensayos de Ames y micronúcleos en médula ósea de ratones, los resultados obtenidos en este ensayo no evidenciaron la inducción de RC y SLA.

ABSTRACT. The D-004 is a lipidic extract obtained from the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, consisting of reproducible mixture of fatty acids and esters, where the oleic, the lauric and palmitic acids are the main compounds. D-004 show similar and sometimes lightly better effectiveness than *Saw palmetto* in the treatment of the Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) induced by testosterone in rodents. In this work we determine the genotoxic effects of D-004 using the single cell electrophoresis (Comet) assay in leukocytes of NMRI mice from both sexes. The animals were randomly arranged into fourth groups (4 mice each) and orally treated with D-004 at 500, 1 000 and 2 000 mg/kg or vehicle during 14 days. At the end of the treatment samples of leukocytes were collected and imbibed in agarose, lysed, exposed to electrophoresis and stain with silver nitrate in order to analyze the induction of strand breaks (SB) or alkali-labile sites on DNA. No single induction of SB plus ALS on DNA was observed as a consequence of the administration of the D-004 to the NMRI mice, neither evidences of treatment-related toxicity was detected. The results agreed with the other genotoxicologic studies performed (The Ames test and bone marrow micronucleus assays) and provided us with new evidences of the innocuousness of the D-004 as a genotoxic agent.

INTRODUCCION

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un alargamiento no maligno de la próstata, y se manifiesta en más de un 50 % de los hombres por encima de los 50 años.^{1,2}

Este padecimiento es, al parecer, más común en la raza negra que blanca, aunque algunas evidencias sugieren que la presencia de antecedentes familiares de HPB incrementan su riesgo.³ La génesis de la HPB depende de dos factores: los andrógenos testiculares y el proceso de envejecimiento. El andrógeno más importante de la próstata es la dihidrotetosterona (DHT). Al envejecer, el nivel de DHT en los machos permanece mayormente constante, aunque los niveles de testosterona (T) en el plasma disminuyen. La DHT se forma por la reducción de la T por la enzima 5 α -reductasa, la cual tiene dos isoenzimas. La 5 α -reductasa tipo 2 es predominante en el tejido genital y en la próstata.⁴

Para el tratamiento farmacológico de la HPB existen diversas opciones, entre las que se incluyen: 1) los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa (finasteride y dutasteride), 2) los antagonistas α_1 -adrenérgicos (doxazosin, terazosin, tamulosin y alfuzosin), y 3) la combinación de un inhibidor de la 5 α -reductasa y un antagonista α_1 -adrenérgico.⁵

El *Saw palmetto* (*Serenoa repens*) es una planta oriunda de regiones del sureste de Norteamérica, perteneciente a la familia de las palmáceas. El extracto de *Serenoa repens* es un popular agente fitotera-

péutico comúnmente empleado en el tratamiento de los síntomas urológicos asociados a la HPB, y ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA).^{6,7} Aunque su mecanismo de acción se desconoce, este agente es bien aceptado por su fácil disponibilidad y buena tolerabilidad. La eficacia del *Saw palmetto* es comparable con el finasteride y con los antagonistas α_1 -adrenérgicos.⁸

Los extractos lipídicos de *Serenoa repens* han mostrado efectos tóxicos muy bajos en estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónicos desarrollados en ratas y ratones.⁹ La determinación de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratón y mutaciones puntuales en el ADN en *Salmonella typhimurium*, con y sin activación metabólica (test de AMES), no revelaron signos de genotoxicidad atribuibles al *Saw palmetto*.^{9,10}

En la flora cubana se cuenta con diferentes especies pertenecientes a esta familia de palmáceas, como la palma real (*Roystonea regia*), planta endémica y de abundantes poblaciones.

El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes (Datos de archivo: Departamento de Química, Centro de Productos Naturales).

El tratamiento oral con D-004 inhibe significativamente la HPB inducida por T, no por DHT, en roedores, lo que ha hecho suponer que su acción se deba, al menos parcialmente, a la inhibición de la 5 α -reductasa prostática.¹¹

Los resultados obtenidos han mostrado que, en modelos experimentales, el D-004 presenta una eficacia similar o ligeramente superior a los extractos de *Saw palmetto*, lo que hace concebir el uso potencial del D-004 en el tratamiento de la HPB.^{11,12}

El D-004 posee acción antioxidante *in vivo*. Dosis repetidas de 400 mg/kg de D-004 inhiben los procesos oxidativos inducidos por la ovariectomización en ratas. Esto se ha evidenciado por el incremento significativo de la capacidad antioxidante total del plasma, la disminución significativa de las concentraciones de malondialdehído (MDA) en plasma, y la disminución de la susceptibilidad de preparaciones de membrana provenientes de hígado y cerebro a la peroxidación lipídica.¹³

Las evaluaciones toxicológicas agudas realizadas en ratas Wistar

machos y conejos F1 de ambos sexos, por vía oral, revelaron una toxicidad muy baja. En ambos estudios, al igual que en otro en el que se empleó la vía intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley (SD) de ambos sexos, el tratamiento con D-004 no indujo mortalidad, utilizando (2g/kg) como dosis máxima recomendada para estos modelos. Estos resultados fueron corroborados en el estudio toxicológico agudo oral empleando el método de las clases en ratas SD de ambos sexos. El mismo permitió evidenciar que el D-004 presenta una toxicidad intrínseca baja, ya que la dosis de 2 000 mg/kg no indujo muerte ni signos indicativos de toxicidad en ninguno de los sexos, por lo que su toxicidad se puede declarar como no clasificable según este método (Datos de archivo: Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales).

En la evaluación de dosis repetidas de D-004 por vía oral durante 90 días (500, 1 000 y 2 000 mg/kg), y en la realizada durante 6 meses (500, 750 y 1 000 mg/kg) en ratas SD de ambos sexos, no se encontró toxicidad atribuible al tratamiento en ninguno de los niveles de dosis empleados, al no presentarse afectaciones del peso corporal en los indicadores bioquímicos y hematológicos estudiados en ninguno de los sexos. Los hechos anteriores están en concordancia con lo reflejado en los estudios histopatológicos, al no detectarse daño en tejidos u órganos.¹⁴

Como todo producto en desarrollo, resulta necesario investigar la genotoxicidad potencial de esta sustancia, ya que pese a su relativa similitud con los extractos de *Saw palmetto*, presenta diferencias que la distinguen como una nueva sustancia.

Teniendo en cuenta los resultados promisorios revelados por los estudios farmacológicos del D-004, se hace necesario continuar su estudio genotoxicológico preclínico a través de la inducción de rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, asociado al incremento de especies reactivas del oxígeno u otros compuestos capaces de inducir este tipo de daño al ADN en leucocitos de sangre periférica.

El objetivo del presente trabajo consiste en investigar el posible efecto genotóxico de la administración oral *in vivo* del D-004 en ratones NMRI, adultos jóvenes y de ambos sexos, mediante la aplicación de la electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones NMRI adultos jóvenes (4-6 semanas) de ambos sexos, (25-30 g de peso), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Habana, Cuba). Los animales fueron adaptados durante siete días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en $25 \pm 2^\circ\text{C}$, la humedad entre el 55-60 % y la iluminación en ciclos de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para roedores preparado en el CENPALAB.

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio, y los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación

Después de corroborar sus especificaciones de calidad, el D-004 utilizado fue suministrado por el Departamento de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales. La sustancia fue administrada en forma de emulsión, usando como agente vehículo Tween 60/agua (2 %).

Las emulsiones se prepararon diariamente dos horas antes de la administración. Se realizaron los ajustes de las dosis según el incremento del peso corporal semanal por grupos de experimentación. Las mismas se verificaron a través del análisis cromatográfico llevado a cabo por el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales.

Para este estudio se fijaron las dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de D-004. Esto se debe a que la dosis de 400 mg/kg ha mostrado efectividad en diferentes modelos de HPB en roedores^{11,12} así como en la evaluación de su acción inhibidora de los procesos oxidativos inducidos por la ovariectomía en ratas.¹³ Además, los resultados de los estudios toxicológicos agudos y subcrónicos en roedores, donde la dosis máxima empleada fue de 2 000 mg/kg, no evidenciaron mortalidad ni signos indicativos de toxicidad asociada al D-004.¹⁶

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente (4 ratones/grupo/sexo, véanse referencias al respecto)¹⁵⁻¹⁷ y se les administró D-004 por vía oral, mediante entubación gástrica a volumen constante (5 mL/kg), durante

Tabla 1. Efecto de la administración oral del D-004 durante el estudio Cometa en ratones NMRI de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
(% Nucleoides)							
Control	H	69,75 ± 18,14	37,50 ± 10,02	56,50 ± 6,45	5,00 ± 8,04	0,75 ± 0,96	0,25 ± 0,50
	M	59,50 ± 6,81	48,00 ± 2,31	46,25 ± 3,86	4,00 ± 3,27	1,75 ± 1,01	0,00 ± 0,00
500	H	66,75 ± 11,44	42,75 ± 8,3	49,00 ± 7,62	7,00 ± 3,27	1,25 ± 0,96	0,00 ± 0,00
	M	71,50 ± 9,40	36,50 ± 6,61	57,00 ± 6,98	5,00 ± 3,16	1,50 ± 2,38	0,00 ± 0,00
1 000	H	62,75 ± 9,21	47,25 ± 8,92	44,00 ± 10,90	7,50 ± 3,51	1,25 ± 0,96	0,00 ± 0,00
	M	67,50 ± 6,61	41,25 ± 9,07	52,75 ± 12,42	3,50 ± 4,36	2,25 ± 1,89	0,25 ± 0,50
2 000	H	73,50 ± 9,47	38,00 ± 9,20	52,75 ± 11,44	7,25 ± 4,99	1,75 ± 2,06	0,25 ± 0,50
	M	70,50 ± 9,47	38,50 ± 10,47	54,50 ± 9,88	5,00 ± 2,94	2,00 ± 2,16	0,00 ± 0,00

cinco días/semana en horas de la mañana, en un periodo de 14 días. A los animales control se les suministró el vehículo a igual volumen de administración con respecto a los grupos de tratamiento con D-004.

Toma de muestras

Al concluir el período de tratamiento, los animales fueron anestesiados bajo atmósfera de éter hasta la pérdida de los reflejos. Luego, se extrajo una gota de sangre de la cola (equivalente a 20 µL) con una pipeta automática para verterla en un vial previamente heparinizado (10 µL), manipulando las muestras a 4 °C. El muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Electroforesis alcalina de células individuales

Las muestras (20 µL) fueron suspendidas en 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (0,5 %), y se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa. Posteriormente, las láminas fueron sumergidas en solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1 % Tritón, 10 % DMSO, pH 10) por 1 h a 4 °C y sometidas a 20 min de desenrollamiento en solución reguladora de electroforesis (3 % NaOH 10 N, 0,5 % EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se realizó a 300 mA y

1 V/cm durante 20 min. Las láminas fueron lavadas con solución reguladora de neutralización (Tris 0,4 M, pH 7,5) y aclaradas con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0,05 % y los nucleoides así teñidos fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz (OLYMPUS BH2).¹⁸

Análisis visual

Fueron analizadas 200 células (leucocitos) por animal (100 leucocitos por gel). Se cuantificaron 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa fue clasificada acorde a la categoría correspondiente entre 0 y 4, según el grado de daño al ADN,¹⁹ desde células con ausencia de cometa (tipo 0, células no dañadas) hasta células con cometas (tipo 4, células totalmente dañadas). Los cometas tipo 1 son representativos de células con mínima frecuencia detectable de lesiones en el ADN, mientras que los cometas de tipo 2 y 3 son representativos de células con un daño moderadamente bajo a una frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN respectivamente.²⁰

La magnitud del daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo al sistema propuesto por Collins,¹⁹ con valores posibles en un rango de 0 hasta 400 de tal forma que el número de cometas observados fue multiplicado por la clasificación de los mismos (0

a 4) y los valores obtenidos fueron sumados en cada gel.²¹

El procedimiento para el cálculo de (UA) puede ser resumido en la siguiente ecuación:

$$AU = \sum i \cdot TCG(i)$$

Donde $TCG(i)$ es el total de células clasificadas con grado de daño al ADN.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre todos los grupos para el análisis de los pesos se realizó empleando el test ANOVA, mientras que para analizar parámetros del ensayo cometa (UA y los diferentes niveles de daño) se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se estableció a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$. Los análisis se hicieron usando el paquete de programas StatSoft para Windows.²²

RESULTADOS Y DISCUSION

En los animales controles y en los tratados con D-004 a 500, 1 000 y 2 000 mg/kg como dosis máxima, se evaluó el daño en los leucocitos de sangre periférica producto de la formación de rupturas de simple cadena (RC) y de sitios lábiles al álcali (SLA) en el ADN. El porcentaje de nucleoides no dañados (nivel 0) encontrado en los grupos controles no difiere con respecto al detectado en los animales tratados con D-004 (Tabla 1). De igual modo, la distribución en los distintos

niveles de daño (nivel 1-4) obtenida para los grupos controles tampoco difiere con respecto a los tratados con 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de D-004.

El análisis del daño observado, expresado mediante las UA, que brinda una información integral del daño inducido al ADN, tampoco evidencia diferencias de relevancia estadística o biológica entre los grupos tratados y el control en ninguno de los sexos.

Teniendo en cuenta que la inducción de rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN están asociados al incremento de especies reactivas del oxígeno, los resultados sugieren que el D-004 no induce la producción de radicales libres, ni modifica negativamente el balance pro-oxidante en leucocitos de sangre periférica.

Aunque los resultados del presente estudio no evidencian una acción protectora del D-004 al ADN, sustentan en parte los resultados de investigaciones anteriores que mostraron los efectos inhibitorios del D-004 sobre la peroxidación lipídica tras su adición *in vitro* ó su administración oral a ratas, en modelos donde se evaluó la capacidad del D-004 sobre un daño oxidativo inducido. Así, el D-004 inhibió la peroxidación lipídica *in vitro* de fracciones microsomales de hígado y cerebros de ratas inducidas por diferentes agentes oxidantes, y su administración oral a ratas (400 mg/kg) inhibió los procesos oxidativos inducidos por la ovariectomización.¹³

Por otra parte, estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en otros estudios genotóxicos como el Test de Ames, con y sin activación metabólica, donde el tratamiento con D-004 no fue citotóxico ni mutagénico en ninguna de las cepas estudiadas.²³ Además, la evaluación del potencial citotóxico, clastogénico y genotóxico del D-004 *in vivo* empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores, en los cuales se empleó la dosis máxima para este tipo de estudios (2 000 g/kg), también ha arrojado resultados negativos.²⁴ Se han encontrado hallazgos similares en extractos de plantas como la *Gryllus bimaculatus* y semillas de *Hydnocarpus laurifolia*, ricas en ácidos grasos encontrados en el D-004.^{25,26}

CONCLUSIONES

El tratamiento oral de D-004 a dosis de hasta 2 000 mg/kg no induce rupturas de simple cadena y/o la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, por lo que no se comporta como un agente genotóxico en este modelo.

Estos resultados negativos están en correspondencia con los obtenidos en otros estudios genotóxicos, como el ensayo de Ames y el de micronúcleos en médula ósea de roedores, lo cual incrementa la evidencia de la ausencia de genotoxicidad del D-004.

BIBLIOGRAFIA

1. Wilt T., Ishani A. and Mac Donald R. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. **Cochrane Database Sys Rev**, 3, CD001423, 2002.
2. Bruskewitz, M.D. Benign prostatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. **Curr Opin Nephrol Hypert**, 5, 455-9, 1995.
3. Balletine C.H. Prostate disorders 2006. In: Prostate Disorders, (AN 21349559), 1-89, 93, 2006.
4. Bartsh G., Rittmaster R.S. and Klocker H. Dihydrotestosterone and the role of the 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. **Urology A**, 41, 412-24, 2002.
5. Tarter T.H. and Vaughan E.D.jr. Inhibitors of 5α-reductase in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Curr Phar Des**, 12, 775-83, 2006.
6. Small J.K., Bombardelli E. and Morazzoni P. Serenoa repens (Bartram). **Fitoterapia**, 68, 99-113, 1997.
7. Bent S., Kane C., Shinohara K., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes E. S., et al. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. **N Engl J Med**, 354, 557-66, 2006.
8. Fong Y.K., Milani S. and Djavan B. Role of the phytotherapy in men with lower urinary tract symptoms. **Curr Opin Urol**, 15, 45-8, 2005.
9. Khwaja T.A. and Friedman E.P. Pharmaceutical grade *Saw palmetto*. US Patent 6039950, 2000.
10. Degenring F.H., Sokolowski A., Suter A. and Weber M. Salmonella typhimurium reverse mutation assay with the Serenoa repens extract. **The European Phytojournal**, 2, 2001.
11. Arruzazabala M.L., Carbajal D., Mas R., Molina V., Rodríguez E. and González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (Roystonea regia) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. **Drugs Exptl Clin Res**, 30, 227-33, 2004.
12. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., Molina V., Rodríguez E. and González V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostate hyperplasia induced with testosterone and dihydrotestosterone in rats. **Curr Ther Res**, 65, 505-14, 2004.
13. Pérez Y., Menéndez R., Gámez R., González R.M., Mas R., Pardo B. y Mendoza S. Efectos de la administración oral de D-004 (400 mg/kg) sobre la peroxidación lipídica en ratas ovariectomizadas. **Rev CENIC Cienc Biol**, 36, No. Especial, 2005.
14. Gámez R., Mas R., Noa M., Menéndez R., García H., Rodríguez Y., et al. Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from Roystonea regia fruits, in rats. **Drugs Exp Clin Res**, 31, 101-8, 2005.
15. Tice R.R., Aguerri E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., et al. Single Cell Gel/Comet Assay for *IN Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environ Mol Mutagen**, 35, 206-21, 2000.
16. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, 18, 1, 45-51, 2003.
17. Patel S., Pandey A.K., Bajpayee M., Parmar D. and Dhawan A. Cypermethrin-induces DNA damage in organs and tissues of the Mouse: Evidence from the comet assay. **Mutat Res**, 607, 2, 176-83, 2006.
18. Gonzalez J.E., Gámez R., Rodeiro I. y Aleman C. Tinción de plata para ADN en el ensayo cometa: repetibilidad y sensibilidad de la variable longitud de migración. 4^{to} Taller nacional y 2do Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. Pérez E., Ed. Editorial CNIC, La Habana, 2002.
19. Collins A.R. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. **Mol Biotechnol**, 26, 249-61, 2004.
20. da Costa Lopes L., Albano F., Laranja G.A.T., Alves L.M., e Silva L.F.M., de Souza G.P., et al. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicol Lett**, 116, 189-98, 2000.
21. García O. and Mandina T. DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. **Mut Res**, 565, 2, 191-7, 2005.
22. StatSoft Inc. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, O.K., 1998.
23. Gutiérrez A., Marrero G., Gámez R., Fernández I., Curveco D. y García H. Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. **Rev CENIC Cienc Biol**, 36, No. Especial, 2005.
24. Fernández I., Gámez R., Gutiérrez A. y García H. Evaluación Genotóxica *in vivo* del D-004 en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea en Ratones. **Rev CENIC Cienc Biol**, 36, No. Especial, 2005.
25. Ahn M.Y., Bae H.J., Kim I.S., Yoo E.J., Kwack S.J., Kim H.S., et al. Genotoxic Evaluation of the Biocomponents of the Cricket, *Gryllus bimaculatus*, Using Three Mutagenicity Tests. **J Toxicol Environ Health A**, 68, 23-24, 2111-8, 2005.
26. Sini H., Mohanan P.V., Devi K.S. Studies on the insecticidal activity, cytogenecity and metabolism of fatty acid rich fraction of *Hydnocarpus laurifolia*. **Toxicol Environ Chem**, 87, 91-8, 2005.