

Evaluación mutagénica *in vivo* del D-004

In vivo mutagenic evaluation of D-004

MSc. Ariadne Gutiérrez Martínez, Dr. C. Rafael Gámez Menéndez, Dra. Rosa Mas Ferreiro, MSc. Daniel Arencibia Arrebola, Téc. Edy Goicochea Carrero

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el D-004 es un extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*), con actividad farmacológica en modelos experimentales de hiperplasia prostática.

Objetivo: evaluar el efecto genotóxico *in vivo* del D-004 administrado por vía oral a ratones machos.

Métodos: se emplearon ratones tratados por vía oral, con dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de D-004 en los ensayos de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y ensayo cometa, y con dosis de 500, 1 000 y 1 500 mg/kg en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. Como control positivo se usó la ciclofosfamida.

Resultados: el D-004 no modificó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados ni disminuyó la proporción entre eritrocitos poli y normocromáticos comparado con los controles. No se observaron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides ni en la frecuencia de espermatozoides normales y anormales entre los diferentes grupos. El D-004 no indujo aberraciones cromosómicas al ser comparado con el grupo control negativo. El análisis del daño observado, no mostró la inducción de ruptura de cadenas y sitios lábiles al álcali en el ADN como consecuencia de la administración del D-004.

Conclusiones: los resultados indican que el D-004 no presenta actividad genotóxica tanto en células somáticas como en germinales de roedores.

Palabras clave: D-004, ratones, genotoxicidad, *Roystonea regia*.

ABSTRACT

Introduction: D-004, a lipid extract from the fruits of royal palm tree (*Roystonea regia*), has proved to be pharmacologically active in different experimental models of prostatic hyperplasia.

Objective: to assess the *in vivo* genotoxic effect of D-004 in orally administered male mice.

Methods: male mice were treated by oral gavage at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg of D-004 in micronucleus assay, chromosome aberrations test and comet assay. And with doses of 500, 1000 and 1500 mg/kg in the morphology assay of the spermatozoid head shape. Cyclophosphamide was used as positive control.

Results: *Bone marrow micronucleus:* D-004 did not change the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes, neither diminished the ratio between polychromatic and normochromatic erythrocytes compared with the controls. Non significant differences were found in the spermatozoid concentrations, nor in the frequency of normal or abnormal spermatozoids among the groups. *Chromosomal aberrations:* D-004 did not induce chromosomal aberrations compared with negative controls. *Comet assay:* No single induction of strand breaks or alkali-labile sites on DNA was observed as a consequence of the administration of the D-004. *Sperm morphology:* There were no significant differences in the sperm concentration and frequency of normal and abnormal head shape of sperms among the different groups.

Conclusions: these *in vivo* results indicate that D-004 does not show evidence of genotoxic activity both in germinal and somatic cells of rodents.

Key words: D-004, mice, genotoxicity, *Roystonea regia*.

INTRODUCCIÓN

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) (*Arecaceae*), constituido por una mezcla de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico, el palmítico y el mirístico son los más abundantes.¹ El tratamiento por vía oral con D-004 previene significativamente la hiperplasia prostática inducida por testosterona, no por dihidrotestosterona.^{1,2}

Ha sido demostrado que el D-004 inhibe la 5 α -reductasa prostática *in vitro*,³ sin afectar el enlace de la dihidrotestosterona (DHT) en próstata de ratas⁴ y que antagoniza las respuestas a los receptores α 1-adrenérgicos, con efectos marcados y modestos sobre las mediadas por los receptores urogenitales y cardiovasculares, respectivamente.^{4,5}

Los estudios de toxicidad por dosis orales únicas y repetidas, no han revelado toxicidad asociada al D-004.^{6,7}

El ensayo de Ames no demostró actividad genotóxica o citotóxica (*in vitro*) asociada al tratamiento con D-004.⁸ De igual modo, el D-004 no mostró potencial estrogénico ni antiestrogénico en el ensayo uterotrópico en ratas.⁹

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto genotóxico *in vivo* del D-004 administrado por vía oral a ratones en los siguientes ensayos: micronúcleos en médula ósea, aberraciones cromosómicas, electroforesis alcalina de células individuales (cometa) y morfología de la cabeza del espermatozoide.

MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones adultos jóvenes (5 a 8 semanas, 20-30 g), por ser la especie más frecuentemente empleada en la evaluación genotóxica y de la que disponemos de datos históricos en el laboratorio. Fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los animales se adaptaron durante siete días a las condiciones del laboratorio: temperatura 25 ± 2 °C, humedad 50-70 % y los ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para roedores preparado en el CENPALAB. El acceso al alimento y al agua fue *ad libitum*. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba.

Administración y dosificación. El D-004 utilizado fue suministrado por las plantas de Producción del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, cumpliendo con las especificaciones de calidad establecidas. El D-004 se administró en forma de emulsión aceite-agua, usando como vehículo Tween 65 (2 %). Las emulsiones se prepararon diariamente antes de la administración y sus concentraciones se ajustaron en función de los valores medios de los pesos corporales por grupos de experimentación. El D-004 fue administrado por vía oral mediante sonda intragástrica. Como control positivo se empleó la ciclofosfamida, en administración única 24 h antes del sacrificio por vía intraperitoneal (50 mg/kg).¹⁰

En los ensayos de micronúcleos (5 días de administración), aberraciones cromosómicas y cometa se emplearon dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de D-004, en esquema de dosis repetida de 5 días de administración en micronúcleos y 14 días para aberraciones cromosómicas y cometa. En el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se emplearon dosis de 500, 1 000 y 1 500 mg/kg durante 8 semanas de administración.

En todos los casos como control negativo se incluyó un grupo tratado con el vehículo (Tween 65-agua, al 2 %)

Al término los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, previa anestesia en atmósfera de éter.

Ensayos de micronúcleos. Los animales tratados con D-004 y los controles negativos se sacrificaron pasadas 24 h de la última administración. El grupo tratado con ciclofosfamida a las 48 h de la única administración.

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con suero bovino fetal. La médula obtenida se centrifugó y luego de eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos, se fijaron con metanol absoluto y luego se tiñeron con giemsa al 5 %.

Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP). Posteriormente se calculó la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos. Todas las determinaciones (índice de citotoxicidad (EP/EN) y frecuencia de EP micronucleados (MN-EP) se realizaron en base a 2 000 células/animal.¹¹

Ensayos de aberraciones cromosómicas. Los animales tratados con D-004 y los controles negativos se sacrificaron pasadas 24 h de la última administración. El grupo tratado con ciclofosfamida a las 48 h de la única administración. Cuatro horas antes del sacrificio, se detuvo la división celular utilizando colchicina (6 mg/kg) por vía i.p. Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con SBF. La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Las células del botón se trataron con KCl (0,075 M) y posteriormente se realizó una segunda centrifugación. El botón celular obtenido se fijó con una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) y a continuación 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 %. Se contabilizaron 100 metafases por animal para determinar el número de aberraciones por célula, número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y frecuencia de rupturas, intercambios o intracambios cromosómicos y cromatídicos. También fue calculado el índice mitótico y el número de células con poliploidía.¹²

Ensayo cometa. Pasadas 24 h de la última administración los animales fueron anestesiados bajo atmósfera de éter, 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. Los 20 µL de sangre se suspendieron en 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (0,5 %), y se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa. Posteriormente, las láminas se sumergieron 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 se sometieron 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 se lavaron con solución reguladora de neutralización (Tris 0,4 M; pH 7,5) y se aclararon con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0,05 %.

Se analizaron 200 células (leucocitos) por animal (100 leucocitos por gel). Se cuantificaron 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa se clasificó según el grado de daño al ADN. La magnitud del daño en el ADN se expresó en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con el sistema propuesto por *Collins*.¹³ El procedimiento para el cálculo de las UA puede ser resumido en la siguiente ecuación: $AU = \sum_i TCG(i)$; donde TCG (i) es el total de células clasificadas con grado de daño al ADN.^{13,14}

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. Pasadas 24 h de la última administración, los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción de ambos

epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos y fueron depositados en placas Petri una disolución isotónica de NaCl 0,9 %.

Para el conteo de espermatozoides, el contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25 %, transcurridos 5 min se realizó una disolución del homogenato tripsinizado en NaCl-formol 1 % (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer para el conteo.¹⁵

Para el análisis de la morfología del espermatozoide, al tubo que contenía la dilución del homogenato ya diluido, se le añadieron cinco gotas de eosina 1 % y se le dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto. Se analizaron 500 espermatozoides. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana y sin gancho, así como espermatozoides con dos colas.¹⁶

El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada nivel de dosis, utilizando un análisis de varianza ANOVA, en los ensayos de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y cometa. Mientras que en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide los datos se procesaron con el estadígrafo no paramétrico de la U de Mann Whitney. Todas las pruebas utilizadas fueron de dos colas. Un nivel de $\alpha = 0,05$ fue a priori establecido para la significación estadística. El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete de programas Statistics para Windows.

RESULTADOS

Ensayo de micronúcleos. El tratamiento no indujo cambios en el índice EP/EN, el cual es un indicador de la proliferación celular en médula ósea, ni incrementó la frecuencia de aparición de micronúcleos en relación con los controles negativos. Los grupos tratados con ciclofosfamida evidenciaron el comportamiento esperado ante este mutágeno ([tabla 1](#))

Ensayo de aberraciones cromosómicas. La [tabla 2](#) muestra los resultados del estudio. La administración de dosis de hasta 2 000 mg/kg de D-004 no indujo incremento en el número de células con AC, ni en las células con poliploidía. A su vez, ninguno de los niveles de dosis estudiados modificó el índice mitótico, resultados similares para ambos sexos. Los grupos tratados con ciclofosfamida evidenciaron el comportamiento esperado ante este mutágeno.

Ensayo cometa. 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 3](#)). 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 D-004.

Por otra parte, el análisis de las UA, que brinda una información integral del daño inducido al ADN, tampoco evidencia diferencias estadística o biológica entre los grupos tratados y el control.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. La administración por vía oral de dosis repetidas de D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg.), durante ocho semanas a ratones, tiempo que asegura la exposición durante un ciclo espermatogénico completo, no ocasionó cambios en la concentración de espermatozoides, ni incrementó la frecuencia de formas anómalas en la morfología de la cabeza del espermatozoide ([tabla 4](#)).

DISCUSIÓN

En este trabajo se aborda la evaluación genotóxica del D-004, compuesto de grandes potencialidades en el tratamiento de la HPB, empleando una batería de ensayos que en su conjunto permiten realizar una valoración objetiva sobre si el extracto lipídico de los frutos de la *Roystonea regia*, presenta acción citotóxica y/o genotóxica en células de mamífero *in vivo*. Además todos los resultados aquí expuestos son obtenidos en animales machos, aspecto relevante tomando en consideración la indicación esperada en la clínica para el D-004. En cada uno de los ensayos realizados se emplean dosis elevadas y un esquema de tratamiento que permite aseverar que las células estudiadas estuvieron bajo la acción del compuesto en estudio o sus metabolitos en los momentos de mayor vulnerabilidad ante la acción de mutágenos y citotóxicos: la división celular.

Dosis de hasta 2 000 mg/kg de D-004 no indujeron daños en los cromosomas tal como lo evidencian los resultados del ensayo de MN y de AC en médula ósea, blanco especialmente sensible por encontrarse en perpetuo proceso de división celular.

Los MN son fragmentos nucleares remanentes en el citoplasma luego de ser expelido el núcleo principal en el curso de la eritromaduración. La presencia de MN en los eritrocitos constituye la evidencia de rupturas cromosómicas, o daño en el aparato del huso mitótico por la acción de mutágenos. Por su parte, la mayoría de las aberraciones cromosómicas observadas en células metafásicas, obtenidas con este diseño experimental, son estructurales, 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. En los dos estudios los resultados obtenidos con la ciclofosfamida confirman la sensibilidad de los mismos ante la acción de mutágenos. Sin embargo, en ambos estudios los resultados obtenidos en los grupos tratados con D-004 a los diferentes concentraciones de dosis son comparables con el control negativo, con valores que se encuentran dentro del rango notificado para esta especie/línea,^{17,18} descartando una acción genotóxica.

Por otra parte, la potencialidad de que altas dosis de D-004 provoquen daño directo al ADN no es observada al estudiar leucocitos de sangre periférica. 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. Estos resultados están en correspondencia con estudios que demuestran la acción antioxidante del D-004 en modelos *in vitro* y en estudios *in vivo*.¹⁹

En correspondencia con los resultados negativos anteriores obtenidos en células somáticas, el estudio de la acción del D-004 en células germinales no indica acción deletérea tal como muestran los resultados del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Este ensayo cobra particular interés, teniendo en cuenta que el sistema genitourinario masculino es un blanco de acción del D-004, y que esta sustancia parece inhibir la conversión de T en DHT, por lo que resulta de interés particular definir si puede o no afectar la espermatogénesis en algún sentido. El esquema de tratamiento permitió estudiar las células que durante la diferenciación y el desarrollo estuvieron bajo la acción del extracto en estudio o sus metabolitos, lo que demuestra que el D-004 no interfiere en ninguna de las etapas del proceso de diferenciación de las células germinales de ratones en ninguna de las dosis estudiadas.

Podemos concluir que no se muestran acción citotóxica o potencial genotóxico del D-004 en células somáticas y germinales de ratones machos, en nuestras condiciones experimentales, resultados que son consistentes con los obtenidos en ensayos *in vivo* en ambos sexos y estudios *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res.* 2004; 30: 227-33.
2. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostatic hyperplasia induced with testosterone or dihydrotestosterone in a rat model: a randomized, controlled study. *Curr Ther Res.* 2004; 65: 505-14.
3. Pérez Y, Menéndez R, Mas R, González RM. *In vitro* effect of D-004, a lipid extract of the fruit of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*), on prostate steroid 5 α -reductase activity. *Curr Ther Res.* 2006; 67: 396-405.
4. Arruzazabala ML, Mas R, Carbajal D, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. *Drugs R D.* 2005; 6: 281-9.
5. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Noa M, Carbajal D, Mendoza N. Effects of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R D.* 2006; 7: 233-41.
6. 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.* 2005; 31(3): 101-8.

7. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Marrero G, et al. Oral subchronic toxicity of a lipid extract from *Roystonea regia* fruits in mice. *Drug Chem Toxicol.* 2008;31:217-28.
8. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2005;36(Especial):1-5.
9. Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Noa M, Mas R, Goicochea E, et al. Evaluation of D-004 in mature ovariectomized rat uterotrophic assays. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(5):710-5.
10. Perry CS. Differential toxicities of cyclophosphamide and its glutathione metabolites to A549 cells. *Toxic in vitro and in vivo.* 1995;(1):21-6.
11. Hayashi M, Tice RR, MacGregor MJ, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res.* 1994;312:293-304.
12. Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. 1997.
13. Collins AR, Aiguo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine dimers) in human cells. *Mutation Res.* 1995;336:69-77.
14. Tice RR, Agurell D, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35: 206-21.
15. Kempinas WG, Lamano-Carvalho TL. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Lab Animals.* 1988;22:154-6.
16. Wyrobek AJ, Bruce WR. The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans. En: Hollander A, de Serres FH, editor. *Chemical mutagens: principles and methods for their detection.* New York: Plenum Press; 1978. p. 257-85.
17. Salamone M, Mavournin KH. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Mol Mutagen.* 1994;23(4):239-73.
18. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Res.* 1987;189:157-65.
19. Pérez Y, Menéndez R, Gámez R, González RM, Mas R, Pardo B, et al. Efectos de la administración oral de D-004 (400 mg/kg) sobre la peroxidación lipídica en ratas ovariectomizadas. *Rev CENIC Cienc Biol.* 2005;36(No. Especial):11-6.

Recibido: 7 de junio de 2012.
Aprobado: 16 de julio de 2012.

Ariadne Gutiérrez Martínez. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Calle 198, e/ 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu

Tabla 1. Resultados de los efectos del D-004 en el ensayo de micronúcleos en medula ósea de ratón

Grupo (mg/kg)	n	EP	EN	MN	EP/EN	MN-EP (%)
Control	5	1092,0 ±29,9	908,0 ± 29,9	3,2 ± 0,8	1,21 ± 0,07	0,16 ± 0,04
500	5	1061,0 ± 41,7	939,0 ± 41,7	2,8 ± 1,5	1,13 ± 0,10	0,14 ± 0,07
1 000	5	1094,4 ±43,7	905,6 ± 43,7	2,2 ± 0,8	1,21 ± 0,10	0,11 ± 0,04
2 000	5	1099,8 ±31,2	900,2 ± 31,2	2,6± 0,9	1,22 ±0,08	0,13 ± 0,04
CF	5	910,2 ±43,8*	1089,8 ± 43,8*	36,0 ± 5,5*	0,84 ± 0,07*	1,80 ± 0,27*

Determinaciones en 2 000 células/animal, *p< 0,001 (comparación contra el control, ANOVA).

[Regresar](#)

Tabla 2. Resultados de los efectos del D-004 en el ensayo de AC en médula ósea de ratones machos

Grupos	n	IM (%) ^a	Células con poliploidía ^b	Gaps ^b	Aberraciones/500 células/grupo ^b				Células con AC
					Cromosómicas		Cromatídicas		
					Rupt	Inter	Rupt	Inter	
Control	5	5,00 ± 0,51	0	5	0	0	5	1	6
500	5	4,46 ± 0,42	0	2	0	0	1	0	1
1 000	5	4,28 ± 0,83	0	9	0	0	3	0	3
2 000	5	5,32 ± 0,59	1	4	0	2	5	0	7
CF	5	4,06 ± 0,52*	4*	49****	8**	18****	155****	13*	194****

^a X ± DE; ^b *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,001; prueba χ^2 y ANOVA para IM (%).

[Regresar](#)

Tabla 3. Resultados de los efectos del D-004 en el ensayo de cometa en linfocitos de ratones machos

Grupos	n	Unidades arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Control	4	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	4	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	4	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	4	70,50 ± 9,47	38,50 ± 10,47	54,50 ± 9,88	5,00 ± 2,94	2,00 ± 2,16	0,00 ± 0,00

[Regresar](#)

Tabla 4. Resultados de los efectos del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones

Grupo	n	Concentración*	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin gancho	Dos colas
Control	10	1,92 ± 0,36	24,6 ± 4,6	13,1 ± 4,5	1,25 ± 0,54	10,0 ± 2,6	0,25 ± 0,26
500	10	1,79 ± 0,19	26,4±8,4	13,3±5,7	1,80±1,74	11,1 ± 3,9	0,20 ± 0,26
1 000	10	1,77 ± 0,30	26,8±7,1	13,1±3,6	1,35±0,91	12,3 ± 5,3	0,05 ± 0,16
1 500	10	1,81 ± 0,22	29,6±10,1	16,5±5,8	2,10±1,17	10,9 ± 5,7	0,15 ± 0,34

Determinaciones en 500 células/animal.

* Concentración en millones de espermatozoides (10⁶) células/mL.

[Regresar](#)