



Revista CENIC. Ciencias Biológicas
ISSN: 0253-5688
ISSN: 2221-2450
editorial.cenic@cnic.edu.cu
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

Evaluación genotóxica de sustancia lipídica del fruto de acrocomia crispa, en el ensayo de micronúcleos

Gutiérrez Martínez, Ariadne; Gámez Menéndez, Rafael; Meneau Hernández, Rosa Ibis; Nodal Flores, Carlos; Bucarano Llitas, Isury; Goicochea Carrero, Edy

Evaluación genotóxica de sustancia lipídica del fruto de acrocomia crispa, en el ensayo de micronúcleos

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 50, núm. 3, 2019

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263502004>

Evaluación genotóxica de sustancia lipídica del fruto de *acrocomia crispa*, en el ensayo de micronúcleos

Genotoxic evaluation of lipid substance of *acrocomia crispa* fruit, in the micronucleus test

Ariadne Gutiérrez Martínez ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Rafael Gámez Menéndez

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Rosa Ibis Meneau Hernández

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Carlos Nodal Flores

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Isury Bucarano Lliteras

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Edy Goicochea Carrero

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 50, núm. 3, 2019

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Recepción: 02 Diciembre 2019
Aprobación: 20 Diciembre 2019

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263502004>

Resumen: El D-005, sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispa* (palma corajo), contiene una mezcla de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico y palmítico, y ha mostrado efectos antiinflamatorios y antioxidantes en roedores. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico y citotóxico del D-005 usando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratas. Se utilizaron ratas Sprague Dawley, provenientes de un estudio de toxicidad subcrónica (90 días), que se distribuyeron en cinco grupos experimentales de cinco animales por sexo: tres grupos tratados por vía oral con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg), un grupo control negativo tratado con el vehículo y un grupo control positivo (Ciclofosfamida, 20 mg/kg). Los signos clínicos se evaluaron diariamente. Concluido el periodo de administración, se realizó la necropsia a cada animal y se les extrajo el fémur para obtener las muestras. Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromáticos y normocromáticos. Además, se calculó la frecuencia de eritrocitos policromáticos portadores de micronúcleos. No hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y los grupos administrados con D-005 en relación al índice eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a las dosis evaluadas. El índice de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos del grupo control positivo disminuyó significativamente con respecto a los del grupo control negativo, además se observó un incremento significativo de eritrocitos policromáticos portadores de micronúcleos. La frecuencia de aparición de eritrocitos policromáticos portadores de micronúcleos tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos tratados con D-005 y el grupo control negativo, así como la comparación entre los sexos no reveló la existencia de diferencias en ninguno de los indicadores estudiados. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento oral con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg de peso corporal) no induce actividad clastogénica, ni citotóxica en médula ósea de ratas.

Palabras clave: ácidos grasos, ciclofosfamida, ensayo de micronúcleos, eritrocitos, médula ósea, ratas.

Abstract: The D-005, lipid substance of the fruit of *Acrocomia crispa* (corajo palm), contains a mixture of fatty acids, mainly lauric, oleic, myristic and palmitic and has shown anti-inflammatory and antioxidant effects in rodents. The objective of this

study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic potential of D-005 using the rat's bone marrow micronucleus assay. Sprague Dawley rats were used, coming from a subchronic toxicity study (90 days), which were distributed in five experimental groups of five animals per sex: three groups treated orally with D-005 (200, 500 and 1000 mg/kg), a negative control group treated with the vehicle and a positive control group (Cyclophosphamide, 20 mg/kg). Clinical signs were evaluated daily. After the administration period, the necropsy was performed to each animal and the femur was extracted to obtain the samples. The presence of polychromatic and normochromatic erythrocytes was scored. In addition, the frequency of polychromatic erythrocytes carrying micronuclei was calculated. There were no significant differences between the negative control group and the groups administered with D-005 in relation to the polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes ratio, indicating absence of cytotoxic effect of the treatment at the doses evaluated. The polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes ratio of the positive controls decreased significantly with respect to those of the negative controls, in addition a significant increase micronucleated polychromatic erythrocytes was observed. The frequency of occurrence of micronucleated polychromatic erythrocytes, also showed no significant differences between the groups treated with D-005 and the negative control group, as well as the comparison between the sexes did not reveal the existence of differences in any of the indicators studied. The results obtained indicate that oral treatment with D-005 does not induce clastogenic or cytotoxic activity in rat's bone marrow

Keywords: fatty acids, cyclophosphamide, micronucleus assay, erythrocytes, bone marrow, rats.

INTRODUCCIÓN

La inflamación crónica y el estrés oxidativo constituyen factores etiológicos importantes en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades crónicas como el daño pulmonar agudo (DPA) (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000), la cual es muy frecuente en pacientes hospitalizados con estado crítico de salud (Hou et al., 2014). El Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) constituye una de las complicaciones clínicas más severas de esta patología, el cual no solo afecta la calidad de vida de los pacientes, sino que ha sido asociado con elevados índices de mortalidad (38,5% por DPA y 41,1% por SDRA) (Tsushima et al., 2009), por lo que el DPA/SDRA se ha convertido en un serio problema de salud.

La fisiopatología del DPA resulta compleja y multifactorial, si bien no ha sido del todo dilucidada. Generalmente, el DPA se desencadena por factores que deterioran el estado funcional de la membrana alveolo-capilar como son: aspiración del contenido gástrico, sepsis, shock hemorrágico, acidosis e inhalación de agentes tóxicos (Hou et al., 2014; Tsushima et al., 2009; Matute-Bello, Frevert & Martin, 2008; Zhou, Dai & Huang, 2012). Se caracteriza por signos de hipoxemia, distrés respiratorio, edema pulmonar no cardiogénico, aumento de la permeabilidad vascular y daño endotelial (Matute-Bello et al., 2008; Liao et al., 2012).

Una respuesta inflamatoria aguda en vías aéreas ocasiona daños al epitelio y endotelio pulmonar, con la subsiguiente liberación de sustancias oxidantes y proteasas. Por otra parte, los derivados del ácido araquidónico tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos,

están implicados como mediadores proinflamatorios del DPA (Min, Codipilly, Nasim, Miller & Ahmed, 2012). Modificaciones significativas en los niveles de tromboxanos en tejidos, así como de prostaciclina circulante promueven la formación de edema y cambios en la perfusión pulmonar debido al incremento de la síntesis de mediadores de la ciclooxigenasa (COX) -2 (Howden, et al., 2012; Bulmus et al., 2013; Fukunaga, Kohli, Bonnans, Fredenburgh & Levy, 2005). Hasta el presente no se encuentran disponibles estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento de esta patología.

Algunos extractos naturales o sus metabolitos con potencial efecto beneficioso sobre DPA han sido evaluados en modelos experimentales de daño pulmonar inducido por Lipopolisacárido (LPS) o ácido oleico. Por ejemplo, se ha referido que extractos de Ginkgo biloba evaluados en un modelo de DPA inducido por LPS en ratas, redujeron marcadamente la infiltración de neutrófilos y los niveles de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar. Además, lograron la favorable disminución de la permeabilidad vascular y de la migración de leucocitos al fluido bronqueo-alveolar. Por otra parte, algunos polifenoles aislados de extractos naturales como son: la epigallocatequina-3-galato presente en el té verde (*Camelliasinensis L.*) y el ácido elágico presente en la granada (*Punicagranatum*) demostraron ser efectivos en la depleción de moléculas proinflamatorias y otros marcadores importantes del DPA inducido por LPS o ácido oleico en ratones. Otras evidencias preclínicas demuestran los efectos beneficiosos en la modificación de los procesos fisiopatológicos del DPA de la curcumina, extraída de la *Curcuma longa* y la luteolina ampliamente distribuida entre las especies vegetales (Favarin, Robison, Freire & Rogerio, 2013).

El D-005, sustancia lipídica obtenida del fruto de *Acrocomia crispa* (palma corajo), planta endémica de Cuba, de la familia *Arecaceae*, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico y palmítico, mientras el palmitoleico, caprílico, caprico, y esteárico se encuentran en menores concentraciones (González et al., 2015).

Estudios previos demostraron el efecto *in vitro* del D-005 sobre la actividad de las enzimas COX (COX-1/COX-2) y lipooxigenasa (LOX) -5 (Pérez et al., 2017). Estos resultados sugirieron que el D-005 actúa sobre la vía de la 5-LOX evitando la generación de leucotrienos y lipoxinas involucrados en las diferentes fases de la inflamación. Además, se comprobó que el D-005 inhibe la actividad de la COX-2 afectando tanto la afinidad por el sustrato como la velocidad máxima de la reacción, sugiriendo un efecto antagonista no competitivo.

Estudios precedentes demostraron que el D-005 posee efectos antioxidantes dado su capacidad de reducir de manera marcada y significativa las variables oxidativas: malondialdehído (MDA) y grupos sulfhidrilo en tejido prostático y MDA en plasma, en el modelo de hiperplasia prostática inducida por testosterona en ratas (González et al., 2015; Pérez et al., 2015).

Dada la eficacia antiinflamatoria del D-005 demostrada experimentalmente en estudios previos, resulta lógico suponer que el D-005 pudiera presentar efectos beneficiosos sobre el DPA/SDRA. En tal sentido, un estudio reciente demostró que dosis orales únicas de D-005 (5-200 mg/kg) protegieron de modo marcado y significativo del DPA inducido por LPS en ratones (Mena et al., 2019), lo cual estuvo asociado a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes.

Por otra parte, en la evaluación de la toxicidad oral por dosis únicas (2 g/kg de peso corporal) en roedores y conejos, el D-005 no produjo mortalidad ni signos tóxicos, por lo cual su toxicidad se puede declarar como no clasificable según el método de las clases (Gutiérrez, Nodal, Bucarano y Goicochea, 2016; Gutiérrez et al., 2016).

La evaluación de la toxicidad genética es un componente importante de la evaluación de seguridad de los productos farmacéuticos, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico y citotóxico del D-005 usando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratas.

MATERIALES Y METODOS

Este ensayo se realizó de acuerdo con la guía 474 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) (OECD, 1997).

Animales

Considerando el bienestar animal y con el objetivo de disminuir el número de animales a utilizar en estudios toxicológicos, esta prueba ha sido incorporada en un ensayo de toxicidad a dosis repetidas para seguir el principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). Se emplearon muestras provenientes de ratas Sprague Dawley, adultas jóvenes de ambos sexos (6-7 semanas), incluidas en un estudio de toxicidad subcrónica con D-005.

Las ratas procedían del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), y su peso corporal oscilaba entre 160-210 g al término de la cuarentena (7 días), etapa en la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 20-25° C, la humedad entre 50 y 70 % y ciclos de luz- oscuridad de 12 horas.

El alimento de los animales fue pienso convencional para roedores proveniente del CENPALAB suministrado a razón de 100 g/kg/día durante todo el estudio. El acceso al agua fue *ad libitum*.

El estudio se desarrolló de acuerdo a las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) vigentes en la República de Cuba, las cuales siguen los principios metodológicos internacionales.

Sustancia de ensayo

El D-005, sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispera* (palma corajo), se obtuvo en el Grupo de Química Farmacéutica de la Unidad de Productos Naturales (UPN), tras corroborar su composición por cromatografía gaseosa, con su correspondiente información relativa a la pureza y a las condiciones de estabilidad. Esta sustancia contiene una mezcla de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico, palmítico, esteárico, cáprico, caprílico y palmitoleico. Los lotes empleados fueron: S161112, S171112 y S181112, que cumplen con las especificaciones de calidad de la sustancia establecida por el Grupo de Química Farmacéutica de la UPN.

Administración y dosificación

Para su administración el D-005 fue preparado en forma de emulsión, dos horas antes de la administración, usando como agente tensoactivo Tween 65 (2%). Las concentraciones se prepararon en función de los valores medios de los pesos corporales por grupos de experimentación.

Los animales se encontraban distribuidos aleatoriamente en cinco grupos experimentales de cinco animales por sexo cada uno: tres grupos de tratamiento con D-005 a las dosis de 200, 500 y 1000 mg/kg, un grupo control negativo que solo recibió volúmenes equivalentes del vehículo y un grupo control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg).

En los grupos tratados con D-005 se seleccionó como dosis mayor, 1000 mg/kg teniendo en cuenta que los resultados previos hacen suponer una toxicidad intrínseca baja para la sustancia y que es la máxima dosis recomendada para estudios subcrónicos a dosis repetidas. Las dosis seleccionadas fueron 8, 20 y 40 veces superiores a la dosis efectiva máxima (25 mg/kg) en modelos de DPA inducido por ácido oleico en ratones, respectivamente. La dosis intermedia se incluyó con el objetivo de establecer relación dosis efecto ante el hallazgo de signos indicativos de toxicidad.

Los tratamientos (vehículo o D-005) se administraron por vía oral por ser la que se propone en humanos, utilizándose para ello entubación gástrica, en un rango volumen/peso que se ajusta a lo recomendado para la especie y a las características oleosas de la sustancia investigada, durante 90 días.

Se incluyó un grupo control positivo tratado con ciclofosfamida (CF) (20 mg/kg), administrado por vía intraperitoneal (i.p). Este mutágeno es utilizado comúnmente debido a su capacidad de inducir la formación de micronúcleos.

Observaciones clínicas

En este estudio se registró la mortalidad y la presencia de los siguientes signos clínicos: alopecia, ataxia, nivel de actividad general, catalepsia,

aspecto general, convulsiones, aspecto de la cola, apnea, aspecto de los ojos, disnea, aspecto de los genitales, edema en las patas, aspecto de las heces, epistaxis, aspecto de la orina, piloerección, características de la marcha, lesiones en la piel, nódulos o abscesos, reflejos, ptosis palpebral, taquipnea, lagrimación, salivación, sangrado ocular, temblores. Los animales fueron observados diariamente durante el período experimental

Estudios terminales

Obtención de las muestras: Concluidos los 90 días de administración los animales se anestesiaron con éter y se desangraron hasta morir de acuerdo a un orden aleatorio progresivo. El grupo tratado con CF se sacrificó luego de 48 horas de su única administración. A cada animal se le realizó la necropsia, observando macroscópicamente los órganos y cavidades y se extrajo el fémur derecho para realizar el ensayo de micronúcleos en médula ósea.

Ensayo de Micronúcleos: Luego de extraído el fémur se lavó la cavidad medular por flujo con 3 ml de suero bovino fetal. Las muestras de médula ósea obtenidas se centrifugaron a 1000

r.p.m por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizó una extensión del botón celular en láminas portaobjetos (dos por animal). Las láminas se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado. Posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, procediéndose a su tinción una vez que estuvieron fijadas. Para colorear las láminas se empleó una solución de Giemsa al 5% durante 15 minutos. El conteo de micronúcleos se realizó por dos observadores independientes y las observaciones fueron realizadas “a ciegas” en un microscopio de luz (OLYMPUS BH2, Japón).

Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromáticos (EP) y normocromáticos (EN) en 2000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2000 EP/animal. Posteriormente se calculó la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos, así como el número de eritrocitos policromáticos con un micronúcleo (MN), con dos MN y con más de dos MN en cada uno de los grupos analizados.

Análisis estadístico

El análisis del número de EP y EN, la frecuencia de MN-EP y el índice de citotoxicidad representado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos, se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba Tukey. Los valores se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. En cuanto al número total de MN hallados en 2000 EP, así como el número de eritrocitos policromáticos con un MN, con dos MN o con más de dos MN se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado. El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0,05$. Todos los

análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de micronúcleos (MN) en médula ósea (Schmid, W., 1975; Hayashi et al., 1994), es quizás el ensayo de genotoxicidad *in vivo* más comúnmente usado, por ser un sistema rápido y reproducible para determinar daño cromosómico, a la vez que brinda clara información acerca del efecto de los compuestos químicos sobre la proliferación celular en médula ósea (Salamone et al., 1994). Este ensayo permite detectar la capacidad de determinados compuestos químicos de inducir *in vivo* rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis, produciendo de esta manera micronúcleos. Asimismo, permite extrapolar los resultados obtenidos a aquellos que se obtendrían en ensayos de células germinales empleando las mismas dosificaciones (Waters, D., 1994).

Durante el estudio no ocurrieron muertes ni manifestaciones de toxicidad en los grupos tratados con D-005. Tampoco existieron diferencias significativas entre el grupo control negativo y los tratados con D-005 con relación al índice EP/EN, indicador de la proliferación celular en médula ósea, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a las dosis evaluadas; de modo que las células continuaron su fase normal de diferenciación, proliferación y maduración en la médula ósea. Los valores del índice EP/ EN en las ratas tratadas con CF (20 mg/kg) disminuyeron significativamente con respecto a los de los controles negativos (Tabla 1).

Los micronúcleos (MN) son cuerpos extranucleares que contienen fragmentos de cromosomas dañados o cromosomas enteros que no se incorporaron al núcleo después de la división celular (Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013). En este estudio, se evaluó la presencia de micronúcleos, que son considerados indicadores indirectos de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Akyl & Konuk, 2015).

En este estudio, la frecuencia de aparición de EP con MN, indicador de efecto genotóxico, tampoco mostró diferencias significativas entre el grupo control negativo y los grupos tratados con D-005 de ambos sexos, así como la comparación entre los sexos no reveló la existencia de diferencias en ninguno de los indicadores estudiados. En tanto, el grupo control positivo mostró una frecuencia de EP con MN alta y mayor que los restantes grupos (Tabla 1).

El número de EP con uno, dos o más MN también fue similar en los grupos tratados con D- 005 y el grupo control negativo (Tabla 2). Esto hace suponer que el D-005 no interfiere el funcionamiento del aparato del huso mitótico, ya que, de ser así, se producirían anomalías en la migración de los cromosomas metafásicos, evento este, que ocasiona la formación de micronúcleos conteniendo cromosomas completos. Tampoco provoca

deleciones cromosómicas, daño que constituye una fuente importante en la formación de eritrocitos micronucleados.

Un incremento significativo del número de EP con uno, dos o más MN en ambos sexos mostró el grupo tratado con CF (Tabla 2). 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 como la CF.

La respuesta encontrada en el grupo tratado con CF para todos los indicadores no solo evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno referida por otros autores (Heddle et al., 1991; Richold et al., 1990; MacGregor, Wehr & Gould, 1999), sino que valida la sensibilidad del modelo empleado.

Tabla 1.

Efectos de dosis repetidas del D-005 (90 días) sobre la presencia de MN ($X \pm DE$) en médula ósea de ratas

Grupos	Dosis (mg/kg)	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos						
Control	-	5	1047 $\pm$ 34,9	953 $\pm$ 34,9	1,10 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,07
D-005	200	5	1048 $\pm$ 14,0	952 $\pm$ 14,0	1,10 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,06
	500	5	1030 $\pm$ 19,6	971 $\pm$ 19,6	1,06 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,02
	1000	5	1038 $\pm$ 7,7	962 $\pm$ 7,7	1,08 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,06
CF&	20	5	927 $\pm$ 4,8*	1073 $\pm$ 4,8*	0,86 $\pm$ 0,01*	1,92 $\pm$ 0,29*
Hembras						
Control	-	5	1046 $\pm$ 24,9	954 $\pm$ 24,9	1,10 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,04
D-005	200	5	1037 $\pm$ 15,3	963 $\pm$ 15,3	1,08 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,06
	500	5	1032 $\pm$ 15,3	968 $\pm$ 15,3	1,07 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,06
	1000	5	1046 $\pm$ 46,5	954 $\pm$ 46,5	1,10 $\pm$ 0,11	0,13 $\pm$ 0,05
CF&	20	5	931 $\pm$ 17,4*	1069 $\pm$ 17,4*	0,87 $\pm$ 0,03*	1,86 $\pm$ 0,17*

Tabla 2.

Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea en ratas SD

Grupos	Dosis (mg/kg)	n	MN	EP 1 MN	EP 2 MN	EP +2 MN
Machos						
Control	-	5	12	10	2	0
D-005	200	5	10	8	1	1
	500	5	11	9	1	1
	1000	5	10	9	2	0
CF&	20	5	192*	142*	37*	13*
Hembras						
Control	-	5	14	11	2	1
D-005	200	5	11	9	2	1
	500	5	13	10	2	1
	1000	5	13	10	2	1
CF&	20	5	186*	136*	37*	13**

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento oral con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg) no induce actividad clastogénica ni citotóxica en médula ósea de ratas.

REFERENCIAS

- Akyıl, D. & Konuk, M. (2015). Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. *Environmental Toxicology*, 30(8), 937-945.
- Bulmus, F.G., Gürsu, M.F., Muz, M.H., Yaman, İ., Bulmuş, Ö., Sakin, F. (2013). Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Balkan Medical Journal*, 30(3), 309-314.
- Favarin, D.C., Robison, J., Freire, C.J., & Rogerio, A. (2013). Potential Effects of Medicinal Plants and Secondary Metabolites on Acute Lung Injury. *BioMed Research International*, 1-12.
- Fukunaga, K., Kohli, P., Bonnans, C., Fredenburgh, L.E., & Levy, B.D. (2005). Cyclooxygenase 2 Plays a Pivotal Role in the Resolution of Acute Lung Injury. *Journal of Immunology*, 174(8), 5033-5039.
- González VL, Sierra R, Más R, Pérez Y, Oyarzábal A, Rodríguez E, Molina, V., et al. (2015). Ingrediente Activo para el tratamiento y la prevención de la inflamación y el estrés oxidativo, así como su procedimiento de obtención a partir de los frutos de *Acrocomia crisper* y/o *Acrocomia aculeata*. Certificado No. 24143. Resolución 2979/2015. Concedida en Cuba, Europa y Japón.
- Gutiérrez, A., Nodal, C.R., Bucarano, I. y Goicochea, E. (2016). Toxicología aguda oral del extracto lipídico de *Acrocomia crisper* en ratones NMRI. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(1), 21-26.
- Gutiérrez, A., Nodal, C.R., Bucarano, I., Placeres, R., Tolon, Z., Goicochea, E. (2016). Toxicología aguda en conejos del D-005, extracto lipídico del fruto de la palma corajo (*Acrocomia crisper*). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(1), 51-57.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson Jr FB., et al. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, 312, 293.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., et al. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present and Future. *Environ Molecular Mutagenesis*, 18, 277-279.
- Holmstrom, M. (1988). Sex differences in the micronucleus test: True or False? *Mutation Research*, 3, 177.
- Hou, S., Ding, H., Yin, X., Song, J., Landén, N.X. & Fan, H. (2014). Therapeutic Effect of Intravenous Infusion of Perfluorocarbon Emulsion on LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. *PLoS One*, 9(1), e87826.
- Howden, R., Cho, H.Y., Miller-DeGraff, L., Walker, C., Clark, J.A., Myers, P.H., Rouse, D.C., et al. (2012). Cardiac physiologic and genetic predictors of hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(4), 470-478.

- Liao, Z., Dong, J., Wu, W., Yang, T., Wang, T., Guo, L., Chen, L., et al. (2012). Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF- κ B pathway. *Respiratory Research*, 13(1), 110.
- Luzhna, L., Kathiria, P. & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4, 131.
- MacGregor, J.T., Wehr, C.M. & Gould, D.H. (1999). Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2(4), 509-514.
- Matute-Bello, G., Frevert, C.W., & Martin, T.R. (2008). Animal models of acute lung injury. *The American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(3), 379-399.
- Mena L., Sierra R., Valle M., Molina V., Rodriguez S., Merino N., Zamora, Z., et al. (2019). *Acrocomia crisper* fruits lipid extract prevents LPS-induced acute lung injury in mice. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(1), 16-26.
- Min, J.H., Codipilly, C.N., Nasim, S., Miller, E.J., & Ahmed, M.N. (2012). Synergistic protection against hyperoxia-induced lung injury by neutrophils blockade and EC-SOD overexpression. *Respiratory Research*, 13(1), 58.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (1997). Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.
- Pérez Y, Oyarzábal A, Sierra R, Mas R, Molina V, Jiménez S, V. González. (2016). Effects of D-005, a lipid extract from Corajo palm (*Acrocomia crisper*) fruits, on prostate hyperplasia and oxidative stress in rats. *Academia Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(1), 10-15.
- Pérez, Y., Oyarzábal, A., Sierra, R., Mas, R., Molina, V., Jiménez, S., V. González. (2017). Inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by a lipid extract of *Acrocomia crisper* fruits. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(3), 319-328.
- Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised (pp. 115-141). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Salamone, M.F. & Mavournin, K.H. (1994). Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23(4), 239-273.
- Schmid W. (1975). The micronucleus assay. *Mutation Research*, 31(1), 9-15.
- The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. (2000). Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 342(18), 1301-1308.
- Tsushima, K., King, L.S., Aggarwal, N.R., Gorordo, A.D., D'Alessio, F.R., & Kubo, K. (2009). Acute Lung Injury Review. *Internal Medicine*, 48(9), 621-30.

- Waters, D., Stack, H.F., Jackson, M.A., Bridges, B.A., & Adler, I.D. (1994). The performance of short-term test in identifying potential germ cell mutagens: a qualitative and quantitative analysis. *Mutation Research*, 341(2), 109-131.
- Zhou, X., Dai, Q., &Huang, X. (2012). Neutrophils in acute lung injury. *Frontiers in Bioscience*, 17, 2278-2283.