

Formación en cultivos de células animales en la Unidad de Toxicidad *in vitro* de la Universidad CES

Estudiante
Gavir Sadat Carmona López

Director
Andrés Pareja López

Trabajo de Grado
En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología
Universidad CES
Medellín
Agosto 2022

Formación en cultivos de células animales en la Unidad de Toxicidad *in vitro* de la Universidad CES

Gavir Sadat Carmona López

Resumen

Los cultivos celulares son excelentes modelos experimentales para evaluar los cambios y los efectos que tienen al ser expuestos a sustancias de prueba o compuestos potencialmente tóxicos, por lo que son utilizados en el desarrollo de nuevos fármacos y el estudio toxicológico de diferentes sustancias con potencial uso en humanos. En este sentido, los cultivos celulares se han venido utilizando para la comprensión de diferentes fenómenos biológicos, por lo tanto, se ha convertido en una herramienta clave en la formación de un profesional en Biología. La Unidad de Toxicidad *in vitro* (UTi) de la Universidad CES, es un laboratorio especializado en evaluaciones toxicológicas *in vitro* de contaminantes ambientales, materias primas, ingredientes y productos terminados, mediante la implementación de cultivos celulares como modelos experimentales alternativos a la experimentación animal, por lo cual, se propone realizar una pasantía académica en este laboratorio, en la cual, mediante la participación de actividades relacionadas con la prestación de servicios de toxicidad *in vitro*, presentación de informes, reportes técnicos, capacitaciones en técnicas, equipos y software, se alcancen los objetivos que posibiliten la práctica y adquisición de conocimiento técnico, científico y el fortalecimiento de habilidades blandas, ya que estos aspectos juegan un papel importante para la sostenibilidad y crecimiento de una organización. En la actualidad la producción de conocimiento científico en el área de la Toxicología en Colombia es bajo en comparación con otros países de Latino América, por lo que, formar profesionales en Biología especializados en cultivos celulares puede contribuir al incremento de la actividad científica y desarrollo de esta área de investigación en el país.

Palabras clave: Biotecnología, Biología celular, Toxicología.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	5
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN	6
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 OBJETIVO GENERAL	6
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
4. LOGROS ALCANZADOS.....	7
5. RESULTADOS	8
5.1 CULTIVO DE CÉLULAS, APLICACIONES Y PERSPECTIVA FUTURA	8
5.2 CAPACITACIONES	9
5.3 MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	9
5.4 PRUEBAS DE TOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	10
5.4.1 <i>Aberraciones cromosómicas (OCDE 473)</i>	10
5.4.2 <i>Micronúcleos (OCDE 474)</i>	11
5.5 EQUIPO DE MEDICIÓN Y CAPTACIÓN DE CONTAMINANTES DEL AIRE.....	12
5.6 GESTIÓN DOCUMENTAL.....	13
6. CONCLUSIONES	14
7. RECOMENDACIONES	15
8. BIBLIOGRAFÍA.....	15

1. Presentación

Russell y Burch en 1959, escribieron el libro *“los principios de la técnica experimental humana”* en el cual sustentan que la experimentación toxicológica *in vivo* debe ser remplazada, reducida y refinada, esto se conoce como el principio de las 3Rs (1). Actualmente muchos de estos principios propuestos siguen siendo válidos, pero el progreso hacia la obtención de estos objetivos propuestos hace más de cincuenta años es bastante lento, a pesar del surgimiento de las ciencias Ómicas y el avance tecnológico que ha permitido el planteamiento de hipótesis para comprender los diferentes procesos biológicos (2). Los cultivos celulares, se han convertido en una de las herramientas más utilizadas en biología celular y molecular, ya que estos, son excelentes modelos para estudiar la fisiología y bioquímica de las células bajo condiciones ambientales controladas. Además, son implementados como modelos experimentales para evaluar los cambios y los efectos que tienen al ser expuestos a sustancias de prueba o compuestos potencialmente tóxicos, por lo que, son utilizados en el desarrollo de nuevos fármacos, cosméticos y la fabricación a gran escala de múltiples compuestos biológicos (3). La comprensión de los mecanismos toxicológicos probablemente han sido la única forma de garantizar la seguridad en el uso de productos de uso humano, por lo que, parece lógico empezar a adoptar los cultivos celulares como modelos para mejorar la predicción de las pruebas toxicológicas y reducir la carga sobre los mamíferos (no humanos) que históricamente han sido utilizados para estos ensayos (3, 4).

Adicionalmente, la contaminación del aire se ha convertido en un importante riesgo para la salud pública a nivel mundial, tanto en países desarrollados, como en países en desarrollo. Cada año la exposición a contaminantes del aire tanto en espacios abiertos como en espacios interiores, causa alrededor de 7 millones de muertes a nivel mundial, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (5). En abril de 2022 la OMS reportó que el 99% de la población mundial vive en lugares donde los niveles de contaminación del aire superan los límites de las directrices establecidas (6). Las ciudades más afectadas han implementado amplias redes de monitoreo de la calidad del aire, pero estas redes se dedican a la medición de espacios exteriores, por lo que, existe una limitante para caracterizar la calidad del aire al interior de las infraestructuras urbanas y zonas rurales con alta diversidad biológica, ya que, estos contaminantes también afectan a otras especies (7 p. 15, 32).

En esta pasantía, se pretendió poner a prueba y fortalecer las habilidades adquiridas durante mi proceso de formación como Biólogo en la Universidad CES, en un contexto laboral relacionado con los cultivos de células animales y sus aplicaciones para la implementación de evaluaciones toxicológicas alternativas a la experimentación animal. En el desarrollo, las actividades principales estuvieron asociadas a los procesos de mantenimiento y uso de las líneas celulares, además, también ejecuté las pruebas y el análisis de datos para poner a punto un dispositivo de captación y medición de contaminantes del aire, ya que, en la evaluación del riesgo, además de evaluar los efectos tóxicos de una sustancia, también se debe tener en cuenta la exposición a esta.

2. Reseña de la institución

La Universidad CES es una Universidad autónoma, de carácter privado, no confesional, sin ánimo de lucro y autosostenible de la ciudad de Medellín, Colombia. Fue fundada el 5 de julio de 1977 como Instituto de Ciencias de la Salud CES. En el 2007 recibió del Ministerio de Educación de Colombia la resolución 1371 del 22 de marzo que la reconoce como Universidad (8). La Unidad de Toxicidad *in vitro* de la Universidad CES, ubicada en la Sede Poblado, nace como una idea de emprendimiento desde el programa de Biología de la Facultad de Ciencias y Biotecnología, es un laboratorio especializado en evaluaciones toxicológicas *in vitro* de contaminantes ambientales, materias primas, ingredientes y productos terminados, mediante la implementación de cultivos celulares como modelos experimentales alternativos a la experimentación animal (9). La UTi trabaja con cultivos en 2D y viene implementando el cultivo 3D de células con diferentes fines comerciales, sus procedimientos cumplen con los estándares de calidad NTC- ISO/IEC17025 y se ejecutan bajo la normativa de las buenas prácticas de laboratorio de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (BPL-OCDE). Actualmente, la UTi está en proceso de fortalecimiento de esta línea de trabajo mediante la formación de capital humano, con el propósito de ofrecer nuevas alternativas para la evaluación toxicológica de sustancias y contribuir con el desarrollo del sector toxicológico, cosmético y farmacéutico del país (10).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Adquirir habilidades duras y blandas en un entorno laboral relacionado con cultivos de células animales aplicados como modelos de evaluación toxicológica.

3.2 Objetivos específicos

- Reconocer las ventajas y las limitaciones de los cultivos de células animales en monocapa y tridimensionales.
- Adquirir experiencia en el cultivo de células animales en monocapa y tridimensionales.
- Fortalecer los criterios para el análisis e interpretación de resultados de toxicidad de sustancias.
- Reconocer las pautas establecidas para la elaboración de reportes e informes técnicos correctamente.

4. Logros alcanzados

- Capacitado en normas, procedimientos y controles para el manejo seguro de agentes químicos.
- Capacitado en aplicación de los principios BPL OCDE para implementación en entidades de ensayo.
- Conocimiento de las normas de bioseguridad y los protocolos utilizados en cultivos de células animales 2D, 3D.
- Conocimiento en el uso de los equipos de laboratorio implementados para el mantenimiento y uso de los cultivos de células animales 2D, 3D.
- Conocimiento en la aplicación de pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad de compuestos sobre líneas celulares animales.
- Conocimiento en programación de sensores ambientales mediante placa de desarrollo de código abierto y el software Arduino IDE.
- Conocimiento en análisis e interpretaciones de datos instrumentales y su relacionamiento con los fenómenos de contaminación del aire.
- Elaboración de reportes técnicos y guías de uso.
- Elaboración del proyecto innovador “Equipo de medición y captación de contaminantes del aire” presentado en la versión XXI de las jornadas de innovación e investigación de la universidad CES.
- Conocimiento en el uso de programas para la elaboración de infografías y presentaciones orales que permiten realizar actividades que fomentan la apropiación social del conocimiento.
- Entrevistado en Teleantioquia Noticias para explicar las funciones y aplicaciones del equipo de medición y captación de contaminantes del aire.
- Participación como asistente del taller de cultivo de células internacional dictado por la UTi de la Universidad CES.

5. Resultados

5.1 Cultivo de células, aplicaciones y perspectiva futura

El término cultivo celular, hace referencia al procedimiento mediante el cual se remueven células de un animal o planta, que posteriormente son cultivadas en un ambiente artificial favorable. Estas células pueden ser extraídas directamente de tejidos y disgregadas mediante métodos enzimáticos o mecánicos (3). Los cultivos celulares tridimensionales (3D), permiten a las células crecer e interactuar en un ambiente extracelular en tres dimensiones, a diferencia de los cultivos tradicionales bidimensionales (2D), los cuales son cultivados en una placa formando una monocapa plana. La popularidad de los modelos 3D ha incrementado gracias a que, además de ser una mejor representación de los tejidos *in vivo* y, por ende, más relevantes fisiológicamente, prometen ser una alternativa para promover la erradicación de la experimentación con animales (3). Aunque la experimentación animal ha traído la mayoría de los beneficios a la medicina moderna e innumerables avances en el conocimiento científico base, se ha comprobado que los modelos experimentales basados en similitudes entre especies no se representan entre sí, debido a que las especies han evolucionado según nichos ambientales específicos, lo que implica que presentan antecedentes genéticos, fisiologías y metabolismos divergentes (1 p. 64, 84).

Los cultivos celulares implementados como modelos experimentales se han vuelto muy relevantes en el mundo para la industria cosmética y farmacéutica, ya que estos necesitan constantemente garantizar que sus productos sean seguros para el uso de sus consumidores, además del constante interés por descubrir nuevos ingredientes de origen natural, por lo que, países líderes en este sector como India, China y Estados Unidos son los que más publicaciones científicas han producido en las últimas dos décadas (11). En Latinoamérica, Brasil es el país líder en este sector, seguido por Colombia, pero muy por debajo en términos de producciones científicas publicadas en los últimos años (12), por lo que, podríamos decir que Colombia, es un país que apenas se está desarrollando en este sector y debido a la fuerte tendencia que existe en el mercado hacia el consumo de productos naturales y amigables con el ambiente, convierten este territorio en potencia para la generación de materias primas para la industria de productos cosméticos y farmacéuticos debido a su alta biodiversidad (13).

Todas las actividades ejecutadas en esta pasantía (capacitaciones, participación en la prestación de servicios y proyectos de investigación) aportan al cumplimiento de los objetivos específicos de manera simultánea, ya que, en el desarrollo de las actividades se está reconociendo las ventajas y las limitantes de los cultivos de células a la vez que se adquiere experiencia en el cultivo, en la interpretación de resultados y la elaboración de informes técnicos. Estas actividades a su vez estarán aportando constantemente nuevos conocimientos y habilidades que se alinean con el objetivo general de la pasantía.

5.2 Capacitaciones

La UTi es un laboratorio de ensayo donde se llevan a cabo actividades de docencia, investigación y extensión, por lo que, durante las primeras semanas de ejecución de la pasantía, recibí capacitaciones de bioseguridad, primeros auxilios y en normas, procedimientos y controles para el manejo seguro de agentes químicos. También recibí capacitación para el correcto uso de incubadoras, micropipetas, centrifugas, cabinas de bioseguridad, cabina de extracción de gases, autoclave, espectrofotómetro, sonicador, rotaevaporador, plancha de agitación magnética, sensor de pH, balanza analítica, microscopio invertido, microscopio de contraste de fases, cámara de Neubauer y bioimpresora 3D. Por último, recibí certificación en aplicación de los principios BPL OCDE para implementación en entidades de ensayo otorgado por GQSP Colombia – Programa de Calidad para la Cadena de Químicos.

5.3 Mantenimiento de las líneas celulares

Las dos áreas del laboratorio donde se ejecutan todas las actividades relacionadas con los cultivos de células son el área común y el cuarto de células. En el área común se encuentran ubicados los equipos necesarios para la preparación de soluciones, como lo son la plancha de agitación magnética, el sensor de pH y la balanza analítica, allí también se encuentra ubicado el banco de células, nombre que se le da a las líneas celulares de stock que son almacenadas en nitrógeno líquido, estas líneas celulares pueden ser descongeladas y posteriormente subcultivadas para el establecimiento de líneas celulares de trabajo. Los subcultivos se realizan en el cuarto de células, un espacio dotado con una cabina de bioseguridad, incubadoras, microscopio de contraste de fases y microscopio invertido, en el cual, se deben seguir estrictos protocolos de bioseguridad para evitar la contaminación de los cultivos. Los subcultivos se llevarán a cabo según las características de cada línea celular, en general, las células pueden ser cultivadas en suspensión o formando una monocapa. La UTi cuenta con su propio protocolo estandarizado para las líneas celulares CHO-K1 y V79 (monocapa) y L5178YTK (suspensión), estos protocolos pueden ser ajustados a otros tipos de líneas celulares, cada que un cultivo alcanza el nivel máximo permitido de confluencia es subcultivado nuevamente. La concentración celular de un subcultivo puede ser determinada mediante el uso de cámara de Neubauer. En cuanto a los cultivos de células 3D se utiliza la técnica de cultivo de esferoides por gota colgante, ya que las células al interior de esta gota tienden a agregarse y formar estructuras 3D, como se observa en la línea celular HEK001 (Figura 1). Durante el desarrollo de la pasantía tuve la oportunidad de participar del mantenimiento de las líneas celulares BALB/3T3 (fibroblasto de ratón), CHO-K1 (ovario de hámster chino), CACO (cáncer de colon), MDA-MD-231 (cáncer de mama) y THP-1 (leucemia).

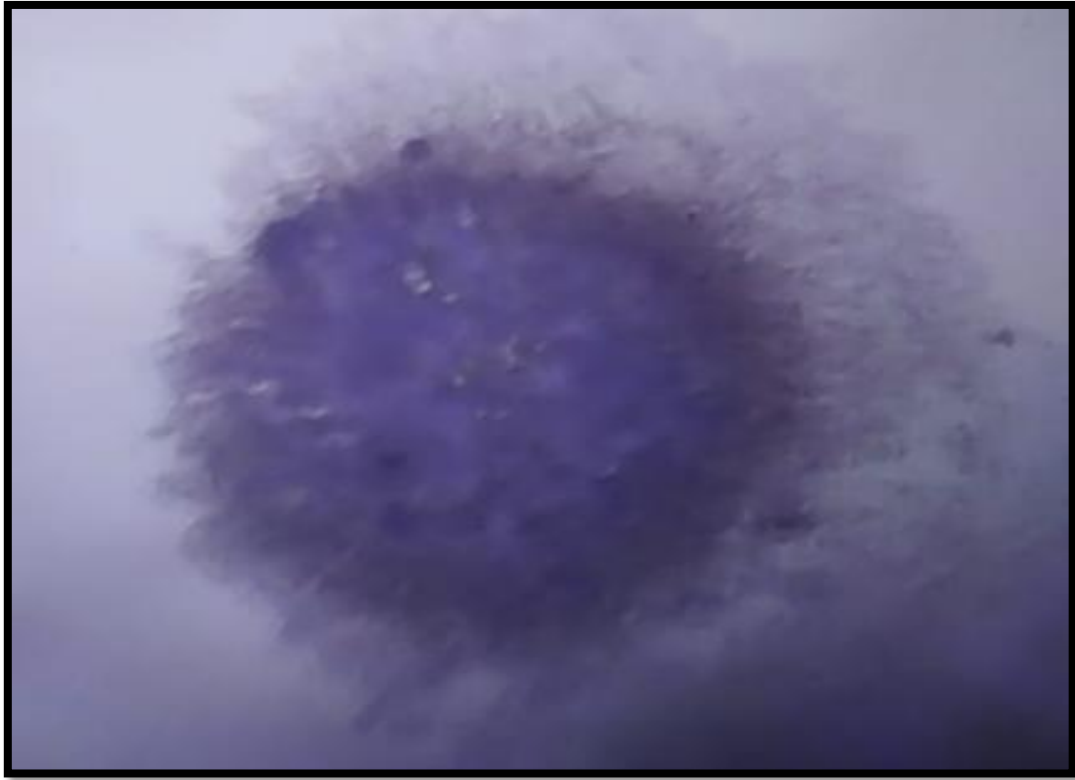


Figura 1. Fotografía de un esferoide de queratinocitos humanos (HEK001), tomada con microscopio tipo lápiz.

5.4 Pruebas de toxicidad *in vitro*

La UTi ofrece en su portafolio diferentes pruebas de toxicidad, las cuales, pueden ser clasificadas en pruebas genotóxicas y citotóxicas. En las pruebas genotóxicas se evalúan los daños en la estructura del ADN en las células causados por las sustancias de prueba; en las pruebas citotóxicas se evalúa la viabilidad celular mediante la cuantificación de la absorbancia a través del uso de un espectrofotómetro después de ser expuesto el cultivo celular a la sustancia de prueba. En el tiempo de ejecución de la pasantía tuve la oportunidad de observar y participar durante la ejecución de dos pruebas de genotoxicidad llamadas aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

5.4.1 Aberraciones cromosómicas (OCDE 473)

El objetivo de la prueba de aberración cromosómica *in vitro* es identificar las sustancias que causan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero cultivadas. Las aberraciones estructurales pueden ocurrir en el cromosoma o en la cromátida. La prueba de aberración cromosómica *in vitro* puede emplear cultivos de líneas celulares establecidas o cultivos celulares primarios de origen humano o de roedores. Las células utilizadas deben seleccionarse en función de la capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad del cariotipo y la frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas (14). En la Figura 2 se muestra un ejemplo de una aberración cromosómica.

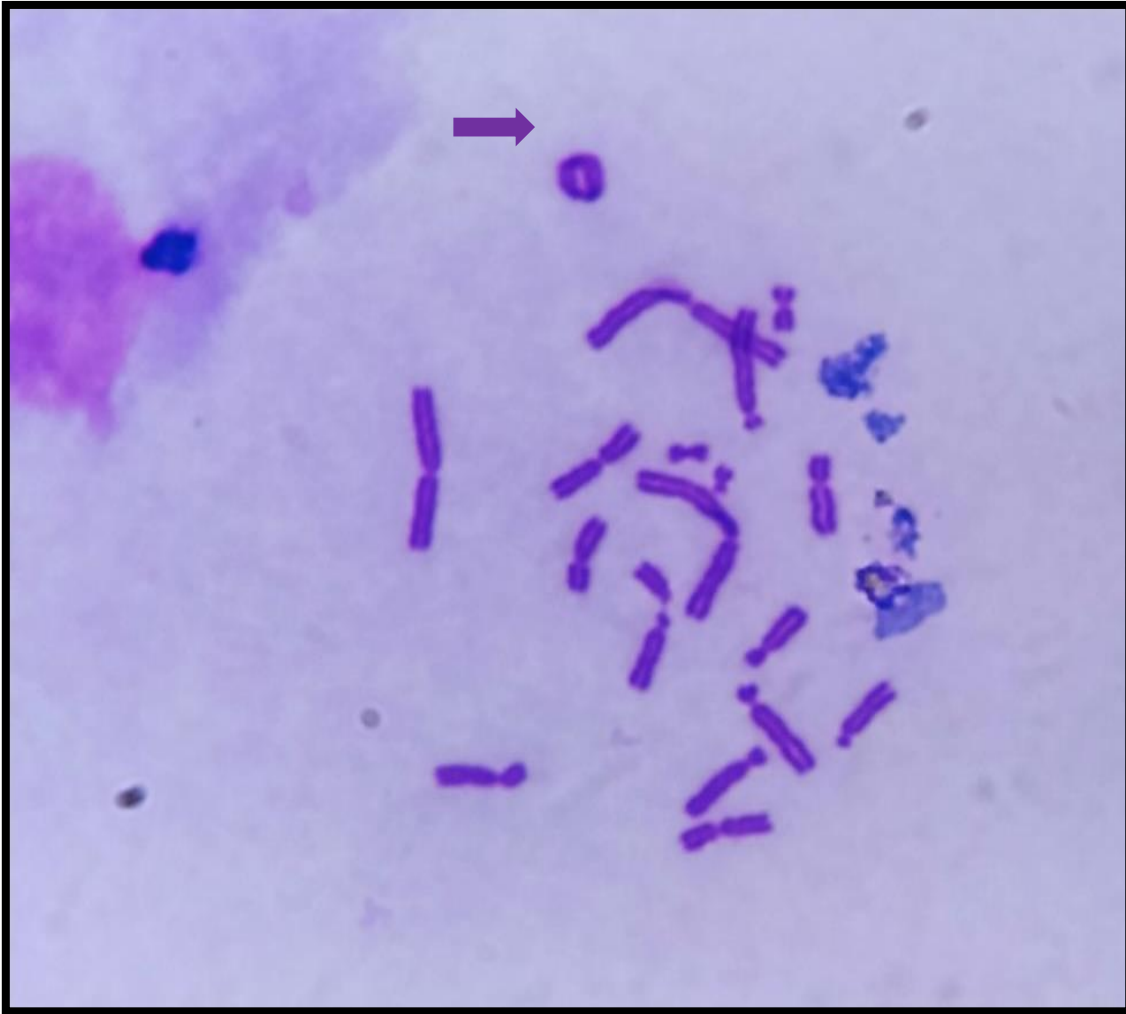


Figura 2. Fotografía del control positivo de la prueba de aberraciones cromosómicas, se observa que una parte del cromosoma se ha desprendido y ha formado un anillo, tomada con microscopio de contraste de fases.

5.4.2 Micronúcleos (OCDE 474)

La prueba de micronúcleos se utiliza para detectar los daños inducidos por la sustancia de prueba a los cromosomas o al aparato mitótico de la línea celular empleada. El objetivo de la prueba de micronúcleos es identificar las sustancias que causan daños citogenéticos que dan lugar a la formación de micronúcleos que contienen fragmentos de cromosomas rezagados o cromosomas enteros. Las células de la línea CHO-K1, en este caso, son cultivadas y expuestas a la sustancia de ensayo con y sin activación metabólica con sus respectivos controles; después de la exposición a la sustancia de ensayo, las células se cultivan con medio MEM + citocalasina B durante un período suficiente para permitir la formación de células binucleadas y de micronúcleos. La visualización o detección de micronúcleos es facilitado en estas células porque carecen de un núcleo principal (15), en la Figura 3 se muestra una célula binucleada por efecto de la citocalasina B.

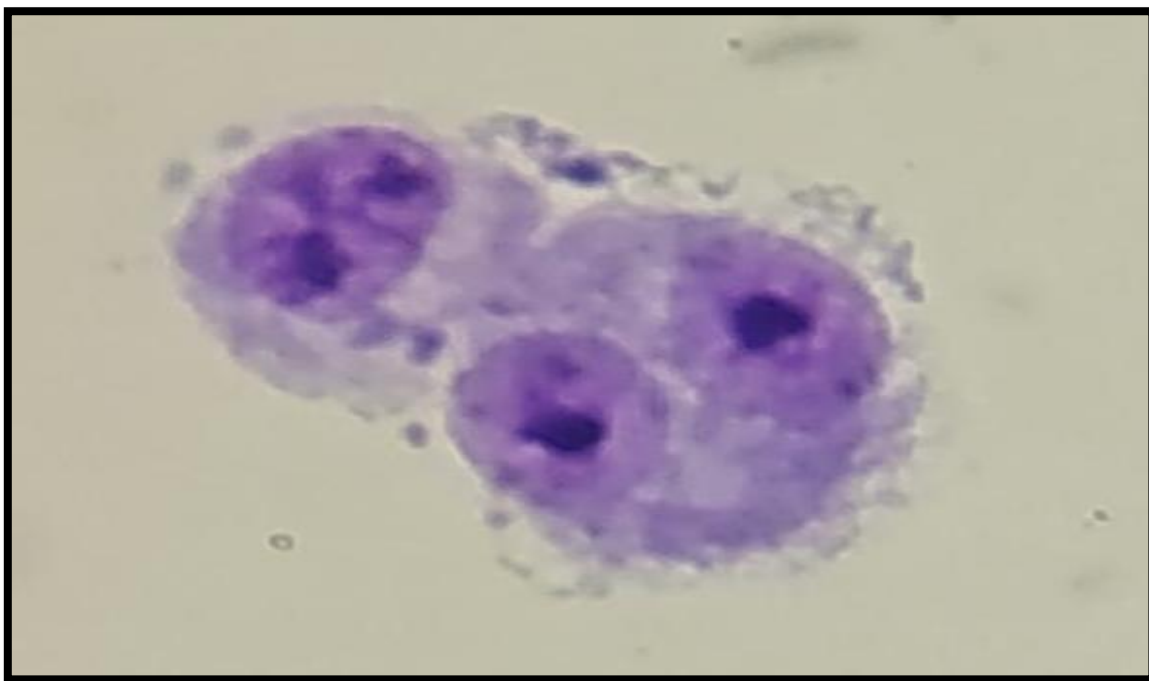


Figura 3. Fotografía de célula binucleada, tomada con microscopio de contraste de fases.

5.5 Equipo de medición y captación de contaminantes del aire

Este dispositivo se me asignó como tarea con la finalidad de comprender tanto su hardware como su software y ejecutar ejercicios exploratorios que permitan su puesta a punto y validación. El dispositivo fue probado y validado, todo el proceso está consignado en el informe final del equipo y su respectiva guía de uso, documentos que reposan en los archivos de la UTi. El equipo de medición y captación de contaminantes del aire (Figura 4), está constituido por una placa de desarrollo de código abierto llamada Linkit One, la cual, fue programada mediante el uso del lenguaje de programación C++ para ser acoplada a tres sensores: SPS30 (Material particulado), BM280 (Humedad, Presión, Temperatura, Altitud), ZE27(Ozono). Además, el equipo cuenta con tres antenas: GSM (antena dispositivos móviles), Wifi + bluetooth, GPS (sistema de posicionamiento global). La fuente de energía es una batería recargable tipo LiPo 3.7V 6000 mAh. Todas las partes electrónicas están dentro de una caja de derivación, la cual está diseñada para resistir la corrosión. En la parte exterior del equipo se encuentra acoplado un ventilador que está conectado a los impactadores en cascada, los cuales, son piezas metálicas agrupadas por discos y en el espacio entre cada disco se disponen filtros diseñados para capturar distintos tamaños de partículas, permitiendo la separación por tamaños del material particulado presente en el aire. El dispositivo cuenta con dos variaciones en su programación para la toma y almacenamiento de datos: Los datos pueden ser monitoreados y almacenados en tiempo real a través la vinculación del dispositivo con la plataforma Ubidots mediante el uso de una SIM card con datos móviles; los datos pueden ser almacenados en una memoria SD y son recuperados manualmente por medio de la conexión USB a un computador. Este dispositivo

fue presentado en las XXI jornadas de investigación e innovación de la Universidad CES como un bien económico que podrá ser implementado por cualquiera de los diferentes sectores económicos y su uso dependerá de los intereses particulares de cada usuario. El dispositivo fue diseñado y puesto a punto para caracterizar la calidad del aire de microambientes y capturar material particulado, sus aplicaciones pueden ser de tipo doméstico, ocupacional, procesos educativos y de investigación.

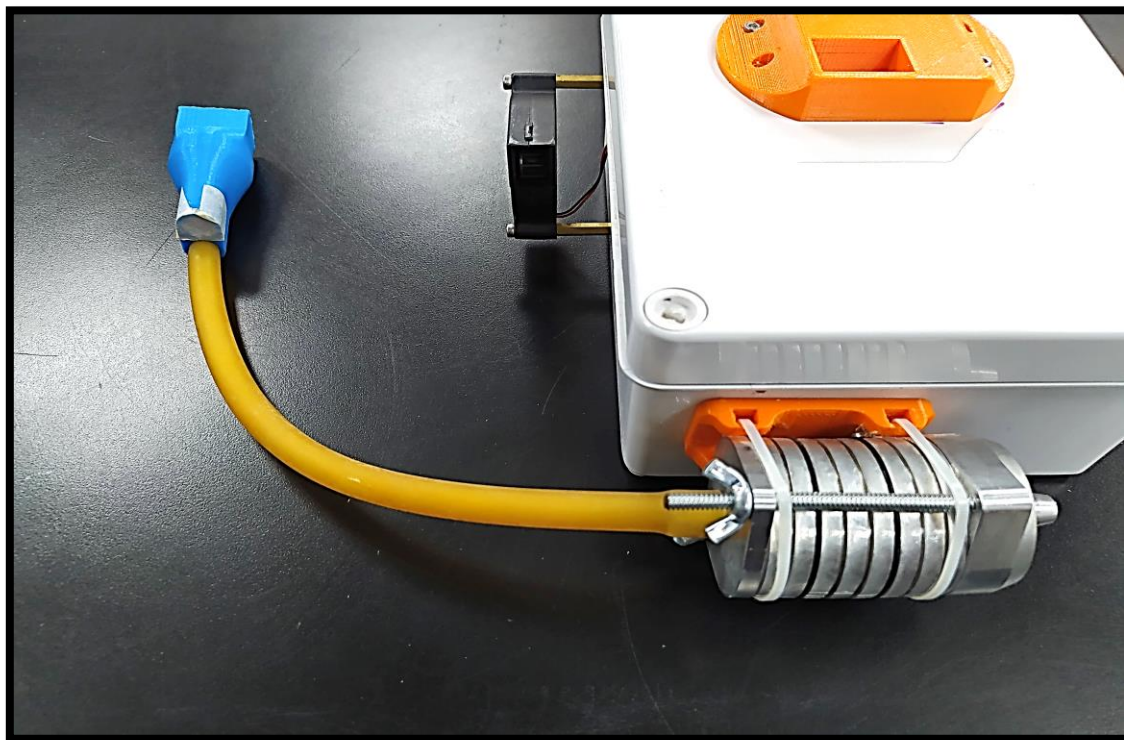


Figura 4. Equipo de medición y captura de contaminantes del aire.

5.6 Gestión documental

En cuanto al apoyo en la gestión documental de la UTi, se me designó la revisión de seis formatos con la tarea de actualizarlos y revisar que estuvieran correctos, sólo los formatos de temperatura y humedad del archivero fueron modificados en su estructura, pasando de tener registros para mañana y tarde a solo un registro por día, este cambio se realiza debido a que en los registros pasados de estos formatos se encontró que no había mucha fluctuación de estas variables entre mañana y tarde. A los demás formatos sólo se les corrigió aspectos de edición del formato, también se generó una nueva guía de uso para el equipo horno secador y una infografía (Figura 5) para la socialización de las problemáticas causadas por la contaminación del aire en el Valle de Aburrá en el marco de la actividad Un Día CES. En cuanto a los equipos de medición y captura de contaminantes del aire, se actualizó la guía de uso, se generó el informe final, dos archivos de modos programación y la escritura del proyecto innovador “Equipo de medición y captura de contaminantes del aire”.

7. Recomendaciones

En caso de que otros estudiantes estén interesados en realizar esta pasantía se tiene las siguientes recomendaciones. Los estudiantes deben contar con mayor disponibilidad de tiempo, ya que los procedimientos experimentales que se llevan a cabo en la UTi tienen un cronograma ajustado a los protocolos experimentales y no a la disponibilidad del estudiante, esta condición, no permite que el estudiante aproveche totalmente los procesos de formación. Recomendando, además, que la modalidad de pasantía como trabajo de grado se haga por un periodo de un año, medio tiempo o de un semestre, tiempo completo.

8. Bibliografía

1. Russell WM. The principles of humane experimental technique. Springfield, Ill: C.C. Thomas; 1959. 238 p.
2. Jennings P. "The future of in vitro toxicology". Toxicology in Vitro [Internet]. Septiembre de 2015 [consultado el 17 de septiembre de 2022];29(6):1217-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.011>
3. Promega Corporation [Internet]. Introduction to 3D Cell Culture; 2021 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/3d-cell-culture-guide/>
4. Thermo Fisher Scientific [Internet]. Introduction to Cell Culture; 2016 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
5. World Health Organization [Internet]. New WHO Global Air Quality Guidelines aim to save millions of lives from air pollution; 2021 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/22-09-2021-new-who-global-air-quality-guidelines-aim-to-save-millions-of-lives-from-air-pollution>
6. World Health Organization [Internet]. Billions of people still breathe unhealthy air: new WHO data; 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/04-04-2022-billions-of-people-still-breathe-unhealthy-air-new-who-data>
7. Parris KM. Ecology of Urban Environments. Melbourne: Wiley & Sons, Incorporated, John; 2016. 240 p.
8. Universidad CES. [Internet]. Historia; 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ces.edu.co/acerca-de-la-universidad-ces/>
9. Universidad CES [Internet]. Unidad de Toxicidad in vitro; 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ces.edu.co/investigacion-e-innovacion/unidades-de-negocio-basadas-en-conocimiento/unidad-de-toxicidad-in-vitro-uti/#secondary-nav>

10. CES Radio [Internet]. Décima octava emisión: entrevista a Andrés Pareja sobre la Unidad de Toxicidad In vitro - EnlaCES Radio - Podcast en iVoox; 2017 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.ivoox.com/decima-octava-emision-entrevista-a-andres-pareja-sobre-audiosmp3_rf_19929509_1.html
11. Scimago Journal & Country Rank [Internet]. Scimago Country Rankings; 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.scimagojr.com/countryrank.php?category=3001>
12. Scimago Journal & Country Rank [Internet]. Scimago Country Rankings; 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.scimagojr.com/countryrank.php?category=3001®ion=Latin%20America>
13. Minciencias [Internet]. Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo; 2016 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://minciencias.gov.co/sala-de-prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo>
14. OECD iLibrary [Internet]. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test; 2016 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264649-en.pdf?expires=1663448452&id=id&accname=guest&checksum=352D0A3834C0617FAD6545EF23AB8772>
15. OECD iLibrary [Internet]. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test; 2016 [consultado el 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1663448585&id=id&accname=guest&checksum=57FBBF846727C692758F599712DC73D7>