

Revista Electrónica Nova Scientia

Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones Balb/c Spontaneous and induced frequency of transplacental micronucleus in Balb/c m

**Daniel Francisco Arencibia Arrebola¹, Luis Alfredo Rosario
Fernández², Yolanda Emilia Suárez Fernández³, Livan
Delgado Roche⁴, y Juan Francisco Infante Bourzac¹**

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Ciudad Habana, Cuba

²Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Ciudad de la Habana, Cuba

³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Municipio San José, Provincia
Habana, Cuba

⁴Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto
de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Ciudad de la Habana, Cuba

Cuba

Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017,
Ciudad Habana, Cuba. E-Mail: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

Introducción: El ensayo de micronúcleos transplacentario, ha sido desarrollado con el objetivo de evaluar el potencial genotóxico en la descendencia y demostrar la capacidad de un agente de causar daños cromosómicos durante el período prenatal. Éste realiza el registro de aberraciones cromosómicas, demostrando si una sustancia determinada puede ser clastogénica o aneugénica en el feto, a través de la exposición materna.

Objetivo: Por lo cual en el presente trabajo se tuvo como objetivo determinar la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones de la línea Balb/c. Pretendiendo vincular de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología.

Materiales y métodos: Se formaron 4 grupos experimentales, el primero un control negativo (simulacro), el segundo control solvente NaCl (0,9%), en el tercero se utilizó la ciclofosfamida en dosis de 50 mg/kg, y el cuarto se utilizó la bleomicina en dosis de 20 mg/kg. Todos los grupos se administraron por vía intraperitoneal los días 14, 15 y 16 de la gestación y 24 h después de la última inoculación se procedió al sacrificio de las gestantes por dislocación cervical. Obteniéndose las muestras de médula ósea materna e hígado fetal.

Resultados: Se obtuvo como resultado los valores espontáneos e inducidos de los índices de citotoxicidad y de genotoxicidad, así como el total de micronúcleos divididos según niveles de daños.

Discusión y conclusiones: Se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en médula ósea materna. Además se demostró que la ciclofosfamida es capaz de inducir mayor citotoxicidad y genotoxicidad que la bleomicina tanto en células de la médula ósea materna como en células hepáticas fetales. Por tanto se demostró el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos vinculando este ensayo de genotoxicidad a la reproducción. Además estos resultados se pudieran utilizar en la evaluación de nuevas drogas con carácter antígenotóxico por vía transplacentaria.

Palabras clave: Micronúcleos transplacentarios, ratones Balb/c, genotoxicidad, embarazo.

Recepción: 15-11-2010

Aceptación: 08-02-2011

Abstract

Introduction: The transplacental micronuclei assay has been developed aimed at evaluating the genotoxic potential in the descendants, demonstrating the capacity of an agent for causing cromosomal damages during the prenatal period. The registration of the cromosomal aberrations shows when a specific substance may be clastogenic or aneugenic in the fetus through the maternal exposure.

Objective: Reason why presently work had as objective to determine the spontaneous and induced frequency of transplacental micronucleis in Balb/c mice. Seeking to link this way the genotoxic and reproductive effect of a drug to evaluate for this methodology.

Materials and Method: They were formed 4 experimental groups, the first a negative control (mockery), the second solvent control NaCl (0,9 %), in the third was used the cyclophosphamide in dose of 50 mg/kg, and the fourth was used the bleomycin in dose of 20 mg/kg. All the groups were administered for intraperitoneal route the 14, 15 and 16 days of the gestation and 24 h after the last inoculation was preceded to the sacrifice of the pregnant for cervical dislocation. Then they were obtained the maternal bone marrow and fetal liver samples.

Results: We obtained the spontaneous and induced values of the citotoxicity and genotoxicity indexes as a result, as well as the micronucleus total divided according to levels of damages.

Discussion or Conclusion: One observes bigger induction of damage in fetal hepatic cells that in maternal bone marrow cells. It was also demonstrated that the cyclophosphamide is able to induce bigger citotoxicity and genotoxicity that the bleomycin of the maternal bone marrow cells as in fetal hepatic cells. Therefore the transplacental clastogenic power of both mutagens was demonstrated linking this genotoxicity assays to the reproduction. These results could also be used in the evaluation of new drugs with antigenotoxic effects for transplacental route.

Key words: Transplacental micronucleus, Balb/c mice, genotoxicity, pregnancy.

Introducción:

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo. Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados (Hayashi *et al.*, 1994).

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas (OECD, 1997; Arencibia *et al.*, 2009).

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. No obstante debido al gran desarrollo que ha obtenido esta ciencia es posible realizarlo en cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de decamación de la vagina de la rata (Schmid, 2000).

La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero. Pero el parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados (Gollapudi y McFadden, 2000).

Este ensayo está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración la farmacocinética y los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados

en ensayos *in vitro*. Por lo general si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o su metabolito activo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo (Gámez *et al.*, 2000).

Estudios realizados con la ciclofosfamida demuestran una íntima relación entre el daño cromosómico causado en el hígado fetal (utilizando el ensayo de micronúcleos transplacentarios) y el efecto teratogénico causado por esta sustancia (Domínguez y Friman, 2000). Porter y Singh plantean la hipótesis, de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez (Porter y Singh, 1998; Fraga *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta estos antecedentes la comunidad de toxicólogos a nivel mundial busca la integración de estudios, que respondan a la “3 R”, donde se reduzcan al máximo el uso de los animales de laboratorios. Además de ser conocida la relación existente entre embriotoxicidad, teratogénesis y genotoxicidad; ya que la expresión del daño genético en células germinales tanto en la madre como en el padre se manifiesta generalmente como infertilidad, abortos espontáneos, muertes embrionarias y reducción del peso fetal.

Por lo cual en el presente trabajo se tuvo como objetivo determinar la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones de la línea Balb/c. Pretendemos vincular de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología. Además realizar la caracterización basal de este fenómeno en la línea de ratones Balb/c, la cual aún no ha sido evaluada.

Destacando que utilizamos para este estudio solo ratones de la línea Balb/c sobre la base de los resultados de nuestras investigaciones donde obtuvimos que esta línea es la más eficiente en este ensayo. Tomando en consideración que en ratones adultos de ambos sexos de esta línea se encontraron los niveles más bajos de frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea; así como la alta sensibilidad a sustancias mutagénicas como la Ciclofosfamida (CF) al ser comparados estos índices con las líneas OF-1, NMRI y C57/BL6/cenp (Arencibia y Rosario, 2010; Arencibia *et al.*, 2009a).

Materiales y Métodos

Animales.

Se utilizaron ratones de la línea Balb/c vírgenes de ambos sexos (Arencibia y Rosario, 2010; Arencibia *et al.*, 2009a), de 9 semanas de edad y fértiles, con un peso vivo entre 25-30 g. Se

mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum* y pienso estándar para esta especie. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos internacionales establecidos para la investigación con animales de laboratorio (CCAC, 1997). Además este ensayo fue realizado y evaluado de acuerdo a los principios fundamentales del comité de ética para la investigación con animales de laboratorios de nuestro Instituto. Siendo aprobado en toda su totalidad.

Apareo.

Pasado el tiempo de cuarentena fueron sometidos al esquema de apareo a razón de 1 macho por cada 2-3 hembras. Aquellas hembras en las que se constató la presencia del tapón espermático al día siguiente del apareo, se les consideró este como el día cero de la preñez (Arencibia *et al.*, 2010).

Administración y dosificación.

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron en función del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (8 ratones hembras/grupo), para un total de 16 ratones hembras/grupo en las dos réplicas realizadas.

El grupo experimental 1 (control negativo), estaba formado por ratones hembras, a las cuales se les realizó la técnica de inoculación de sustancia por vía i.p, como simulacro para que estuvieran expuestas a las mismas condiciones de manejos que los demás grupos.

En el grupo experimental 2 utilizamos como control solvente el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 %, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza. Administrado por vía i.p en dosis de 10 mL/kg. Preparado 2 horas antes de su uso.

En el grupo experimental 3 utilizamos la CF (adquirida de la firma comercial mexicana Lemri S.A bajo la marca de LEDOXINA), utilizada en dosis de 50 mg/kg (Arencibia *et al.*, 2009a; Arcencibia *et al.*, 2010). En el grupo experimental 4 utilizamos la BL, adquirida de los Laboratorios PISA, S.A. de C.V. México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo), siendo utilizada en dosis de 20 mg/kg (Arencibia *et al.*, 2010; Arcencibia *et al.*, 2011). Ambas sustancias se administraron por vía i.p y se diluyeron en disolución salina (NaCl) al 0,9 %. Fueron administradas a razón de 10 mL/kg, preparadas 2 horas antes de su uso.

Se realizó la administración en cada grupo experimental los días 14, 15 y 16 de la gestación y 24 h después de la última inoculación se procedió al sacrificio de las gestantes por dislocación cervical con previa atmósfera en éter. Obteniéndose las muestras de médula ósea materna e hígado fetal (Arencibia *et al.*, 2010).

Exámenes realizados.

Micronúcleos en médula ósea materna, para corroborar la genotoxicidad por vía transplacentaria:

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó gentilmente por flujo introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 3 ml de suero bovino fetal (SBF). La médula así obtenida diluida con el SBF se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones se realizaron “a ciegas”, utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión) (Arencibia *et al.*, 2009; OECD, 1997). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además fue calculada la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo para determinar el grado de genotoxicidad (Arencibia *et al.*, 2009; OECD, 1997).

Micronúcleos transplacentarios en hígado fetal:

Al extraer los fetos, para ser analizados se redujo la camada a 5 fetos/animal, que fueron los analizados (Arencibia *et al.*, 2010). Se realizó una ligera incisión en la cavidad abdominal, extrayendo el hígado en su totalidad. Luego se depositó en un mortero estéril que contenía entre 4-5 mL de suero bovino fetal y con ayuda de una malla metálica se procedió a la maceración. Una vez macerado se centrifugó el líquido a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos (Arencibia *et al.*, 2010). Después de montadas las láminas (mínimo: 2/feto) se mantuvo durante 24 horas a

temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos.

Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones se realizaron “a ciegas”, utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión) (Arencibia *et al.*, 2009; Arcencibia *et al.*, 2010; OECD, 1997). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/feto. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/feto (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo para determinar el grado de genotoxicidad (Arencibia *et al.*, 2009; Arcencibia *et al.*, 2010; OECD, 1997).

Análisis estadístico.

Tanto el índice de citotoxicidad (EP/EN) como el índice de genotoxicidad (EP portadores de MN), se evaluaron por la prueba de análisis de varianza (ANOVA), corroborando que eran cumplidos los supuestos, datos distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), que existía dependencia entre las observaciones y presentaban homogeneidad de varianzas (test de Levene) (Arencibia *et al.*, 2010). Para el caso de la comparación del grado de genotoxicidad dado por el número de EP totales con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado (Arencibia *et al.*, 2010). Siendo el nivel de significación establecido de $\alpha=0.05$ para variables continuas y de $\alpha=0.01$ para variables categóricas.

Resultados

En la tabla 1 se observa que no hubo diferencias significativas en los índices de citotoxicidad y genotoxicidad entre el grupo control negativo y control solvente en médula ósea materna, estos resultados están en concordancia con los hallados anteriormente. No siendo así para el caso de los animales tratados con CF y BL, estos difieren en todas las variables analizadas con los grupos controles negativos y solventes. Se encontraron valores de citotoxicidad en ambos mutágenos menores de 1, para el caso de la CF fue de $0,87\pm 0,01$ y para la BL algo mayor en el orden de $0,95\pm 0,01$. Siendo diferentes significativamente los resultados obtenidos entre mutágenos. De igual forma no difirieron al comparar los índices de genotoxicidad entre los resultados obtenidos

en el grupo control negativo y control solvente. La CF indujo un $1,67 \pm 0,70\%$ de eritrocitos policrómicos con micronúcleos en tanto los resultados obtenidos con el uso de la BL fueron menores y significativamente diferentes a los obtenidos con el uso de la CF, estando en el rango de $1,07 \pm 0,09\%$.

Tabla 1. Índice de citotoxicidad (EP/EN) e índice de genotoxicidad (MN-EP (%)) en médula ósea materna de ratones Balb/c.

Grupo Experimental	n	EP ^F	EN ^F	EP/EN ^F	MN-EP (%) ^F
Control negativo	16	1072 ± 11,4	928 ± 10,2	1,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p	16	1081 ± 23,2	919 ± 23,2	1,18 ± 0,05	0,16 ± 0,10
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p	16	933 ± 9,7ac	1067 ± 9,5ac	0,87 ± 0,01ac	1,67 ± 0,70ac
Bleomicina (20 mg/kg), i.p	16	974 ± 4,22bc	1026 ± 4,67bc	0,95 ± 0,01bc	1,07 ± 0,09bc

Determinación en 2000 células/animal.

* $p < 0.05$ (comparación contra el control negativo, ANOVA).

^F **X** media; **DE** desviación estándar para las dos series experimentales.

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo.

Por otro lado en la tabla 2 encontramos el número total de MN de forma espontánea e inducida en médula ósea materna, por niveles de daño. Se observa que no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y solvente, no siendo así para los tratados con CF y BL. Estos últimos difirieron significativamente con los controles. Observándose mayor inducción de MN por parte de la CF (240) en comparación con la BL (154). Además la CF indujo mayor número de PCE con 1 y 2 MN de forma significativa al compararse con los inducidos por la BL.

Tabla 2. Total de micronúcleos por nivel de daño en médula ósea materna de ratones Balb/c.

Grupo Experimental	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+ 2 MN)
Control negativo	22	13	8	1
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p	23	16	6	1
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p	240ac	146ac	78ac	16ac
Bleomicina (20 mg/kg), i.p	154bc	110bc	34bc	10bc

Determinación en 2000 EP/animal.

* $p < 0.01$ (comparación contra el control negativo, prueba de Chi-cuadrado).

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo.

Al realizar el análisis de los índices de citotoxicidad y de genotoxicidad en células hepáticas de fetos (tabla 3), se observa que no hubo diferencias significativas entre controles, si entre estos y los resultados obtenidos en los dos mutágenos utilizados. El índice de citotoxicidad espontáneo en células hepáticas fetales está en el rango de $1,01 \pm 0,06$ y el % de EP con MN se encuentra entre 0,31-0,35% con una desviación estándar de 0,10-0,16. Para el caso de los resultados obtenidos al comparar los mutágenos se observa que la CF indujo mayor citotoxicidad y genotoxicidad en las células hepáticas fetales siendo significativamente diferentes estos resultados a los obtenidos con el uso de la BL. El índice de citotoxicidad encontrado en los tratados con CF se encuentra en el rango de $0,43 \pm 0,10$ y el % de EP con MN fue de $4,86 \pm 0,29$, en tanto la BL indujo un índice de citotoxicidad menor de $0,69 \pm 0,08$ y el % de EP con MN fue de $2,51 \pm 0,18$.

Tabla 3. Índice de citotoxicidad (EP/EN) e índice de genotoxicidad (MN-EP (%)) en células hepáticas de fetos de ratones Balb/c.

Grupo Experimental	EP ^F	EN ^F	EP/EN ^F	MN-EP (%) ^F
Control negativo	1007 ± 9,7	993 ± 9,7	1,01 ± 0,04	0,31 ± 0,10
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p	1011 ± 10,9	989 ± 10,9	1,02 ± 0,06	0,35 ± 0,16
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p	602 ± 8,1ac	1398 ± 8,1ac	0,43 ± 0,10ac	4,86 ± 0,29ac
Bleomicina (20 mg/kg), i.p	820 ± 9,5bc	1180 ± 9,5bc	0,69 ± 0,08bc	2,51 ± 0,18bc

Determinación en 2000 células/feto. * $p < 0,05$ (comparación contra el control negativo, ANOVA).

^F X media; DE desviación estándar de 5 fetos/animal, de 16 animales/grupo.

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo.

A su vez en la tabla 4 encontramos el número total de MN espontáneos e inducidos en células hepáticas fetales por niveles de daño. No hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y solvente, no siendo así para los tratados con CF y BL, los cuales si difirieron tanto en el total de MN como en sus niveles de daño. El número total de MN espontáneos en células hepáticas fetales se encuentra en el rango de 46-51. Se encontró mayor inducción de MN por parte de la CF (713) en comparación con la BL (368). Además la CF indujo mayor número de PCE con 1 y 2 MN de forma significativa al compararse con los inducidos por la BL. Pero se obtuvo mayor número de PCE con 1 MN con el uso de ambos mutágenos al compararse con el número de EP con 2 o más de 2 MN encontrados.

Tabla 4. Total de micronúcleos por nivel de daño en células hepáticas de fetos de ratones Balb/c.

Grupo Experimental	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+ 2 MN)
Control negativo	46	29	15	2
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p	51	30	19	2
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p	713ac	515ac	167ac	31ac
Bleomicina (20 mg/kg), i.p	368bc	262bc	86bc	20bc

Determinación en 2000 EP/feto (5 fetos/animal de 16 animales/grupo).

* $p < 0.01$ (comparación contra el control negativo, prueba de Chi-cuadrado).

Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo.

Se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en médula ósea materna y los obtenidos al evaluar las células hepáticas de los fetos.

Discusión.

Los resultados espontáneos en los índices de citotoxicidad y genotoxicidad encontrados en células de la médula ósea materna concuerdan con los hallados por nosotros y otros autores al utilizar el NaCl al 0,9% como sustancia solvente (Gámez *et al.*, 2000; Arencibia *et al.*, 2009a; Arencibia *et al.*, 2011).

De igual modo el número total de MN basales encontrados se encuentre en el rango de los reportados para esta especie de ratón y en este sexo, lo cual valida nuestros resultados obtenidos en medula ósea materna (Arencibia *et al.*, 2009a; Arencibia *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el uso de los dos mutágenos, se corroboró la citotoxicidad y genotoxicidad ya conocida de la CF y BL en ratones adultos, ya que los índices que caracterizan esta respuesta fueron similares a los obtenidos por nosotros y otros colaboradores al evaluar y/o utilizar esta línea de ratón en sus investigaciones (Arencibia *et al.*, 2009a; Arencibia *et al.*, 2011; Cancino *et al.*, 2001).

Una vez más se demuestra el uso de la línea de ratones Balb/c como biomodelo ideal en los ensayos de genotoxicidad dada su alta sensibilidad a mutágenos con acción genotóxica desde baja hasta alta potencialidad. Resultados que están en conjunción con los obtenidos al evaluar la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales en células de la medula ósea, así como anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y daño a la estructura primaria del

ADN mediante electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa) (Arencibia *et al.*, 2009b; Arencibia *et al.*, 2010a; Arencibia *et al.*, 2009c; Arencibia *et al.*, 2010b).

El hecho de haberse obtenidos mayores resultados de inducción de MN, así como de citotoxicidad por parte de la CF, demuestra el uso de este como control positivo, además caracteriza la acción de los agentes alquilantes como fuertes clastogénos químicos (Prieto *et al.*, 1999). Resultados que se encuentran en conjunción con un estudio nuestro realizado recientemente, donde la CF indujo un número similar de micronúcleos, al igual que el número de EP con 1, 2 y más de dos MN en ratones Balb/c de ambos sexos (Arencibia *et al.*, 2011).

Por otro lado los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad basal obtenidos en células hepáticas de fetos fueron mayores a los obtenidos en las células de la médula ósea de las madres, lo que demuestra que los fetos a través de la exposición materna son más susceptibles al daño genotóxico medio ambiental y el daño que se logra mediante la alimentación. Además de que como se expreso con anterioridad el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural aumentándose cuando se administra la sustancia durante la preñez (Porter y Singh, 1998; Fraga *et al.*, 2001). Las diferencias significativas encontradas pudiesen estar influenciadas por la línea celular utilizada para evaluar la genotoxicidad basal en los fetos. Aunque en el hígado existen mecanismos de detoxificación, los cuales en la mayoría de los casos permiten una alta capacidad metabolizadora de los xenobióticos, disminuyendo los niveles de genotoxicidad, estos procesos son prácticamente inmaduros en los fetos de ratones de 16-17 días de gestación permitiendo de esta forma evaluar con mayor grado de exactitud el daño genotóxico al nivel evaluado (Cole *et al.*, 1983; Cebal *et al.*, 1998; Saragueta *et al.*, 1998; Muller, 1998; Gad *et al.*, 2007).

Resultados similares obtuvimos al comparar los índices espontáneos e inducidos de daño al ADN mediante electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica y células hepáticas de ratas Sprague Dawley de ambos sexos (Arencibia y Rosario, 2010a).

Los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad transplacentaria obtenidos con el uso de la CF concuerdan con los que obtuvieron Fraga y colaboradores en el 2001, en la línea de ratón NMRI, aunque estos se encuentran algo más altos, pero sin diferir significativamente (Fraga *et al.*, 2001). Resultado que demuestran una mayor susceptibilidad a los mutágenos de la línea Balb/c al compararse con la NMRI.

Además la diferencia significativa encontrada entre la CF y BL, confirma el uso de la CF como control positivo eficiente en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide y en los ensayos de teratogénesis utilizando ratas y ratones como biomodelos experimentales.

El hecho de que la CF haya inducido mayor cantidad de micronúcleos y que el número de estos en EP haya sido mayor, demuestra un mayor poder clastogénico y aneugénico, manifestándose mayor daño medible por este ensayo (Cancino *et al.*, 2001). Esto demuestra la sensibilidad del ensayo de micronúcleos para garantizar la detección de fármacos y principios activos clasificados como clastógenos y sobre todo químicos (Matuo *et al.*, 2007). Por lo general los clastógenos químicos potentes como la CF considerados como agentes alquilantes de bases aumentan la aparición de retardos anafásicos en células somáticas, producto de la formación de monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos (Matuo *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 1999; Te *et al.*, 1997).

Conclusiones

Al final del estudio se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en medula ósea materna. Además se demostró que la CF es capaz de inducir mayor citotoxicidad y genotoxicidad que la BL tanto en células de la medula ósea materna como en células hepáticas fetales. Por tanto se demostró el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos vinculando este ensayo de genotoxicidad a la reproducción. Además estos resultados se pudieran utilizar en la evaluación de nuevas drogas con carácter antigenotóxico por vía transplacentaria.

Referencias

1. Arencibia, D.F y L.A. Rosario. (2010a). Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Cometa. *ARS Pharmaceutica* 51(1):49-56.
2. Arencibia, D.F y LA. Rosario. (2010). El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 27(1):1-8.
3. Arencibia, D.F., A. Vidal, L.A. Rosario, Y.E. Suárez y L. Delgado. (2011). Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Vaccimonitor* 20(1), en prensa.
4. Arencibia, D.F., L.A. Rosario y D. Curveco. (2010a). Comparación de la respuesta de ratones Balb/c de Ambos sexos a la administración de dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Vet Arg* 27(269):1-10.

5. Arencibia, D.F., L.A. Rosario y Y. Rodríguez. (2010b). Daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino. *Biotec Aplic* 27(4), en prensa.
6. Arencibia, D.F., L.A. Rosario y Y.E. Suárez. (2010). Ensayo de micronúcleos transplacentarios en roedores, una buena opción en toxicología experimental. *Retel* 33(4):33-41.
7. Arencibia, D.F., L.A. Rosario, J. Morffi y D. Curveco. (2009). Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 25(3):22-38.
8. Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Rodríguez, Y. López y D. Díaz. (2009b). Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb/c de ambos sexos. *Retel* 23(2):8-22.
9. Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Rodríguez, Y. Martín y D. Díaz. (2009a). Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel* 24(2):7-29.
10. Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Rodríguez, Y. Martín y D. Díaz. (2009c). Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel* 24(2):7-29.
11. Cancino, L., A. Leiva, G. Garrido, M. Cossío y E. Prieto. (2001). VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 20(1):48-53.
12. CCAC. (1997). Canadian Council on Animal Care. Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc; Canada. p155-162.
13. Cebal, E., A. Lasserre, V. Rettori y M. Gimeno. (1998). Anomalías en el desarrollo embrionario temprano luego de la ingesta crónica de alcohol por hembras de ratón. *Medicina* 58(5/2):370-372.
14. Cole, R.J., L. Handerson, N.A. Taylor y T. Reagan. (1983). Short term test for transplacental active carcinogens. A comparison of sister chromatid exchanges and the micronucleus test in mouse foetal liver. *Mutat Res* 113:61-75.
15. Domínguez, Y y M. Friman. (2000). Montaje y estandarización de la técnica de Micronúcleos Trasplacentarios. I Taller Latinoamericano sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. X Congreso Latinoamericano de Toxicología.p.48-53.
16. Fraga, J.R., Y. Domínguez, M. Friman, S.B. González, A.D. Somoza y C. Pérez. (2001). Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirosis vax-SPIRAL[®] empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. *Anuar Toxicol* 1(1):35-39.
17. Gad, S.C., C.H. Frith, D.G. Goodman y B.G. Boysen. (2007). Animal Models in Toxicology. Chapter 2 The Mouse. Toxicology, Pathology and Metabolism. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group LLC.p.24-130.
18. Gámez, R., I. Fernández, P.C. Acosta, C. Alemán, Rodeiro. G y M. Rodríguez. (2000). Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev. CENIC* 31(3):211-216.
19. Gollapudi, B y L.G. McFadden. (2000). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res* 354(2):97-99.
20. Hayashi, M., R.R. Tice, J.T. MacGregor y D. Anderson. (1994). *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res* 312(2):293-304.

21. Matuo, R., R.J. Oliveira, A.F. Silva, M.S. Mantovani y L.R. Ribeiro. (2007). Anticlastogenic Activity of Aqueous Extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing Cells (HTCs) During Cell Cycle. *Toxic Mechan Meth* 17(3):147-152.
22. Muller, L. (1998). Micronucleus induction in mouse and rat fetuses treated transplacentally during histogenesis with Mitomicin C and 7,12- Dimethyl Benz(a) anthracene. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis* 5:70-76.
23. OECD. (1997). Guideline for the testing of chemical. Directrices de OCDE TG 475 (Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells). Anexo B11.p. 5-6.
24. Porter, A y G. Singh. (1998). Trasplacental teratogeneiss and mutagenesis in mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 8:191-203.
25. Prieto, G., C. Errecalde y N. Trotti. (1999). Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet* 19(2):1-8.
26. Saragueta, P., C. Otto y R. Schultz. (1998). Efecto de endotoxinas sobre desarrollo embrionario temprano. *Medicina* 58(5/2):372-373.
27. Schmid, W. (2000). The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9-15.
28. Te, C., J.M. Gentile, B.C. Baguley y A.E. Pearson. (1997). *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 70(1):84-89.

