

Frecuencia espontánea en inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley

Spontaneous and induced frequency of transplacental micronucleus in Sprague Dawley rats

Arencibia, D.F.¹; Rosario, L.A.²; Suárez, Y.E.³; Delgado, L.⁴

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, La Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba.

³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Mayabeque, Cuba.

⁴Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (IFAL, U.H), Avenida 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley, demostrando el efecto clastogénico o aneugénico en el feto a través de la exposición materna y su vinculación con el efecto genotóxico y reproductivo. Se formaron 4 grupos experimentales, 1) control negativo (simulacro), 2) control solvente NaCl (0,9%), 3) ciclofosfamida 50 mg/kg, y 4) bleomicina 30 mg/kg. Todos los grupos se administraron por vía intraperitoneal a los días 14, 15 y 16 de la gestación. A las 48 h posteriores a la última inoculación se procedió a realizar la eutanasia obteniéndose muestras de médula ósea materna y de hígado fetal. Se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en médula ósea materna. Se demostró que la ciclofosfamida es capaz de inducir mayor citotoxicidad y genotoxicidad que la bleomicina en ambos tipos celulares, demostrando el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos vinculando este ensayo de genotoxicidad a la reproducción. Además estos resultados se podrán utilizar en la evaluación de nuevas drogas con carácter antígenotóxico por vía transplacentaria.

Palabras clave: (Micronúcleos transplacentarios), (ratas Sprague Dawley), (genotoxicidad), (embarazo).

Correspondencia *e-mail*: Daniel Francisco Arencibia Arrebola darencibia@finlay.edu.cu

Recibido: 29-12-2010

Aceptado: 16-06-2011

SUMMARY

The aim of this work were to determine the spontaneous and induced frequency of transplacental micronucleis in Sprague Dawley rats, demonstrating the clastogenic or aneugenic effects in the fetus through the maternal exposure, and their linking with the genotoxic and reproductive effect. Four experimental groups were formed, 1) negative control (mockery), 2) solvent control NaCl (0,9 %), 3) cyclophosphamide to 50 mg/kg, and 4) bleomycin to 30 mg/kg. All the groups were administered the 14, 15 and 16 days of the gestation by intraperitoneal route. 48 h to the last inoculation was preceded to the euthanasia, being obtained the maternal bone marrow and fetal liver samples. Bigger induction of damage was observed in fetal hepatic cells when it was compared with maternal bone marrow cells. It was demonstrated that the cyclophosphamide is able to induce bigger citotoxicity and genotoxicity that the bleomycin in both cellular types, demonstrating the transplacental clastogenic potential of both mutagens linking this genotoxicity assay to the reproduction. These results are used in the new drugs evaluation with antigenotoxic effects by transplacental route.

Key words: (Transplacental micronucleus), (Sprague Dawley rats), (genotoxicity), (pregnancy).

INTRODUCCIÓN

La detección *in vivo* de la presencia de micronúcleos (fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados) permite evaluar el efecto de ciertas sustancias genotóxicas¹⁹. Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado pasando a ser una célula anucleada. En el caso de haberse formado un micronúcleo este permanecerá en el citoplasma siendo fácilmente detectado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal¹⁰.

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. No obstante, gracias al gran desarrollo que ha obtenido la toxicología genética, 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 rata¹⁰.

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas. Entre las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la

bleomicina (BL)²¹. La primera es un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas como consecuencia de la aparición de rupturas (efecto de los mecanismos de reparación)²¹. La segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro, produciendo radicales libres^{17, 21}.

Ambas drogas son utilizadas con gran efectividad como antineoplásicas. La CF pertenece al grupo de cloroetilaminas. Con el desarrollo de este agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral; considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular²¹. La BL es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales^{17, 21}. Las células tumorales son más susceptibles a la BL durante la proliferación activa y son demoradas específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular²⁰.

A su vez la comunidad de toxicólogos a nivel mundial busca la integración de estudios que respondan al principio de las "3 R" (Reducción, Refinamiento y Reemplazo). Permitiendo de esta forma la evaluación conjunta de dos efectos relacionados directamente la genotoxicidad y la toxicología de la reproducción, sobre todo el segmento III que evalúa el efecto teratogénico,

reduciendo al máximo el uso de los animales de laboratorios. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley utilizando la CF y BL como mutágenos, demostrando el efecto clastogénico o aneugénico en el feto a través de la exposición materna. Pretendemos vincular de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley vírgenes de ambos sexos, de 8 semanas de edad, con un peso vivo entre 180-210 g al término de la cuarentena. 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*. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos internacionales establecidos para la investigación con animales de laboratorio¹⁴.

Procedimientos éticos: los autores declaramos que este trabajo fue confeccionado sobre la base de buenas prácticas de laboratorio preclínico presentes en el reglamento Nacional de aprobación de protocolos de investigación de la República de Cuba. Además se declara por parte de los autores del artículo que al comenzar esta investigación se obtuvo por escrito el consentimiento de aprobación del protocolo e informe.

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 como el día cero de la gestación¹¹.

Administración y dosificación

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administró 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 ratas hembras/grupo), para un total de 16 ratas hembras/grupo en las dos réplicas realizadas.

El grupo experimental 1 (control negativo), estaba formado por ratas hembras, a las cuales se les realizó la técnica de inoculación de sustancia por vía intraperitoneal (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 se utilizó la CF, adquirida de la firma comercial mexicana Lemri S.A bajo la marca de LEDOXINA, utilizada en dosis de 50 mg/kg^{4, 11}. 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 30 mg/kg^{7, 11, 15}. Ambas drogas se administraron por vía i.p, siendo diluidas 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 48 h después de la última inoculación se procedió a realizar la eutanasia a las gestantes por dislocación cervical con previa atmósfera en éter. Obteniéndose las muestras de médula ósea materna e hígado fetal¹¹.

Exámenes realizados

Micronúcleos en médula ósea materna

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 1000 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 fue realizado por dos observadores independientes. Las observaciones fueron realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión)^{10, 22}. Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2000 células/animal. Se procedió a calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2000 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^{10, 22}.

Micronúcleos transplacentarios en hígado fetal: al extraer los fetos para ser analizados se redujo la camada a 5 fetos/animal, estos fetos escogidos fueron los analizados en este ensayo¹¹. 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 fetal bovino y con ayuda de una malla metálica se procedió a la maceración. Una vez macerado se centrifugó el líquido a 1000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos¹¹. 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 fue realizado por dos observadores independientes. Las observaciones se realizaron "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión)^{10, 11, 22}. Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2000 células/feto. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2000 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^{10, 11, 22}.

Análisis estadístico

Los índices de citotoxicidad (EP/EN) y 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)¹¹. 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^{7, 11, 22} siendo el nivel de significación establecido de $\alpha=0.05$ para variables continuas y de $\alpha=0.01$ para variables categóricas.

RESULTADOS

En este estudio se determinó la presencia de micronúcleos en médula ósea materna con el objetivo de corroborar la genotoxicidad por vía transplacentaria, resultado que se logró al diferir de forma significativa las dos sustancias mutagénicas incluidas en el diseño experimental con los dos grupos controles en todas las variables analizadas para $p<0.05$ en variables continuas y $p<0.01$ para variables categóricas.

Al evaluar los resultados obtenidos en los diferentes test analizados se observó que no

hubo diferencias significativas en los índices de citotoxicidad y genotoxicidad entre el grupo control negativo y control solvente en médula ósea materna (Tabla 1), resultados que están en concordancia con los hallados anteriormente⁴. 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 y genotoxicidad en médula ósea materna que difieren significativamente entre mutágenos. De igual forma difirieron al comparar los índices de genotoxicidad entre los resultados obtenidos en el grupo control negativo y control solvente con los tratados con los mutágenos. La CF indujo mayor genotoxicidad, pero los resultados obtenidos con el uso de la BL fueron menores y significativamente diferentes a los obtenidos con el uso de la CF.

El análisis del total de MN espontáneos e inducidos en médula ósea materna por niveles de daño arrojó que no hubo diferencias significativas entre controles, si entre estos y los resultados obtenidos en los dos mutágenos (Tabla 2). Observándose mayor inducción de MN por parte de la CF en comparación con la BL, existiendo diferencias significativas entre ellos.

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 $1,07 \pm 0,05$ y el % de EP con MN se encuentra entre 0,19-0,29% con una desviación estándar de 0,09-0,14. 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 análisis del número total de MN espontáneos e inducidos en células hepáticas fetales en función del daño arrojó que no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y solvente (Tabla 4), 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. Se encontró mayor inducción de MN por parte de la CF en comparación con la BL. Además la CF indujo mayor número de PCE con 1 y 2 MN de forma significativa al compararse con los inducidos por la BL.

Por otro lado se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en médula ósea materna.

DISCUSIÓN

El ensayo de micronúcleos transplacentarios ha sido utilizado por varios investigadores para demostrar la íntima relación entre el daño

Tabla 1. Índice de citotoxicidad (EP/EN) e índice de genotoxicidad (MN-EP (%)) en médula ósea materna de ratas Sprague Dawley.

Grupo Experimental	n	EP ^F	EN ^F	EP/EN ^F	MN-EP (%) ^F
Control negativo	16	1121 ± 15,2	879 ± 15,2	1,28 ± 0,02	0,16 ± 0,08
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p	16	1115 ± 7,2	885 ± 14,1	1,26 ± 0,04	0,21 ± 0,03
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p.	16	916 ± 5,1ac	1084 ± 5,1ac	0,85 ± 0,01ac	1,90 ± 0,31ac
Bleomicina (30 mg/kg), i.p.	16	968 ± 7,6bc	1032 ± 4,67bc	0,94 ± 0,01bc	1,19 ± 0,04bc

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.

Tabla 2. Total de micronúcleos por nivel de daño en médula ósea materna de ratas Sprague Dawley.

Grupo Experimental	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+ 2 MN)
Control negativo	23	17	5	1
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p.	30	21	7	2
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p.	270ac	162ac	90ac	18ac
Bleomicina (30 mg/kg), i.p.	169bc	125bc	39bc	5bc

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.

Tabla 3. Índice de citotoxicidad (EP/EN) e índice de genotoxicidad (MN-EP (%)) en células hepáticas de fetos de ratas Sprague Dawley.

Grupo Experimental	EP ^F	EN ^F	EP/EN ^F	MN-EP (%) ^F
Control negativo	1048 ± 6,2	952 ± 6,2	1,10 ± 0,03	0,19 ± 0,09
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p.	1035 ± 11,9	965 ± 11,9	1,07 ± 0,05	0,29 ± 0,14
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p.	571 ± 10,0ac	1429 ± 10,0ac	0,39 ± 0,21ac	5,67 ± 1,89ac
Bleomicina (30 mg/kg), i.p.	742 ± 7,4bc	1258 ± 7,4bc	0,59 ± 0,06bc	3,32 ± 1,05bc

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.

Tabla 4. Total de micronúcleos por nivel de daño en células hepáticas de fetos de ratas Sprague Dawley.

Grupo Experimental	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+ 2 MN)
Control negativo	28	17	10	1
Control solvente (NaCl 0,9%), i.p.	41	25	15	1
Ciclofosfamida (50 mg/kg), i.p.	806ac	583ac	180ac	43ac
Bleomicina (30 mg/kg), i.p.	472bc	341bc	96bc	35bc

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.

cromosómico causado en el hígado fetal y el efecto teratogénico causado por sustancias mutagénicas como la CF¹⁶, a partir de la hipótesis planteada por Porter y Singh en el año 1998 de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez²³.

De esta forma los resultados espontáneos

encontrados en células de la médula ósea materna teniendo en cuenta la relación EP/EN y el % de EP con MN concuerdan sin diferir estadísticamente con los resultados hallados previamente al utilizar el NaCl al 0,9% como sustancia solvente en ratas no gestadas^{4,7}.

El número total de MN basales por niveles de daño encontrados son algo más bajos que los

reportados para esta especie de rata en el sexo hembra, pero no difieren significativamente con los encontrados por nuestro grupo de trabajo en ratas SD adultas no gestadas^{4, 7}, quedando como constancia la ocurrencia de genotoxicidad en células de la médula ósea materna (células somáticas)⁴. Además estos resultados descartan la posibilidad de que las ratas gestantes sean más susceptibles a las sustancias mutagénicas.

Al analizar los resultados obtenidos con el uso de los dos mutágenos, se corroboró la citotoxicidad y genotoxicidad ya conocida de la CF y BL en células de médula ósea en ratas hembras adultas. Los resultados de la relación EP/EN y del % de EP con MN en ambos mutágenos fueron similares a los obtenidos por nuestro grupo de trabajo al evaluar esta línea de ratas en ambos sexos en este ensayo y en el de aberraciones cromosómicas en el mismo tipo celular⁴.

Los resultados espontáneos tan bajos e inducidos altos de MN en EP en ratas SD hembras adultas demuestra el uso de esta línea de ratas como biomodelo murino ideal en los ensayos de genotoxicidad, observándose alta sensibilidad a mutágenos con acción genotóxica alta; tal es el caso de la CF y BL. Resultados que están en conjunción con los obtenidos al evaluar la inducción de MN con CF y BL, aberraciones cromosómicas estructurales en células de la médula ósea, 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)^{5-8, 13}.

El hecho de haberse obtenidos mayores resultados de inducción de MN, así como de citotoxicidad por parte de la CF al ser comparados con la BL, demuestra el uso de este como control positivo, además caracteriza la acción de los agentes alquilantes como fuertes clastógenos químicos²³. 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 ratas SD hembras adultas⁷.

El hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre los índices espontáneos de MN en hígado fetal al usar el NaCl contra en control negativo demostró la inocuidad de este solvente; con este grupo se incluyó en el estudio un mayor número de animales, aportándole mayor confiabilidad a nuestros resultados. Además permitió que se obtuvieran por primera vez los índices espontáneos de citotoxicidad y genotoxicidad mediante la formación de micronúcleos en fetos de ratas de la línea SD. No existiendo estudios anteriores que nos permitieran comparar los obtenidos por nosotros contra otros grupos de trabajo.

Los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad transplacentaria obtenidos con el uso de la CF se encuentran en valores superiores a los obtenidos por Fraga y colaboradores en el 2001, en la línea de ratón NMRI¹⁸. Esto demuestra mayor susceptibilidad de los fetos de ratas SD a la acción de sustancias mutagénicas.

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^{3, 2, 9, 12} y en los ensayos de teratogénesis utilizando ratas y ratones como biomodelos experimentales^{25, 26}.

El hecho de que la CF haya inducido mayor cantidad de micronúcleos y que el número de estos en EP haya sido mayor que en la BL, demuestra un mayor poder clastogénico y aneugénico, manifestándose mayor daño medible por este ensayo^{19, 22}. No obstante se demostró el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos vinculando este ensayo de genotoxicidad a la reproducción.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestra a su vez la sensibilidad del ensayo de micronúcleos para garantizar la detección de fármacos y principios activos que utilizan este mecanismo para ejercer efecto genotóxico y/o mutagénico.

Por otro lado, los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad espontáneos obtenidos en células hepáticas de fetos fueron mayores a los obtenidos en las madres. Esto pudiese estar influenciado por la línea celular utilizada para

evaluar la genotoxicidad basal en los fetos, ya que en el hígado se biotransforman todos los productos del metabolismo endógeno¹. Por ende este tipo celular siempre manifestará mayor daño genético que las células sanguíneas.

Resultados similares se obtuvieron 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 SD de ambos sexos⁵.

Dado que no se han analizado los micronúcleos en células hepáticas maternas, esto podría constituir una sugerencia futura del presente estudio, permitiendo comparar estos resultados con los obtenidos en células hepáticas fetales. En la presente investigación solo se analizaron muestras provenientes de las madres con el objetivo de demostrar que los fetos estaban expuestos a un ambiente genotóxico.

CONCLUSIÓN

Se demostró el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos así como la vinculación de este ensayo de genotoxicidad a la reproducción. La CF fue capaz de inducir mayor citotoxicidad y genotoxicidad que la BL tanto en células de la médula ósea materna como en células hepáticas fetales. Se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en médula ósea materna de ratas SD. Estos resultados permitirán el uso de este biomodelo experimental en la evaluación de nuevas drogas con carácter antigenotóxico por vía transplacentaria, aún no exploradas en este ámbito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, C. Función inmunológica del hígado desde la perspectiva de la vacunación terapéutica. *Biotech Aplic.* 2009; 27:1-9.
2. Arencibia, D.F., Gámez, R., Gutiérrez A. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en Ratones OF-1. *Rev. CENIC Cien Biol.* 2009; 40:29-32.
3. Arencibia, D.F., Gámez, R., Gutiérrez, A. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de Roystonea regia, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Rev Toxicol.* 2009; 26:127-130.
4. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Vet Arg.* 2010; 27:1-13.
5. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. 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.* 2010; 51:49-56.
6. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Theoria.* 2009; 18:7-13.
7. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Retel.* 2010; 29:1-15.
8. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. Respuesta de Ratones SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Retel.* 2010; 28:1-14.
9. Arencibia, D.F., Rosario, L.A. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET.* 2011; 12:1-13.
10. Arencibia, D.F., Rosario, L.A., Morffi, J., Curveco, D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel.* 2009; 25:22-38.
11. Arencibia, D.F., Rosario, L.A., Suárez, Y.E. Ensayo de micronúcleos transplacentarios en roedores, una buena opción en toxicología experimental. *Retel.* 2010; 33:33-41.
12. Arencibia, D.F., Vidal, A., Rosario, L.A., Delgado, L. Comparación de la respuesta de ratas Sprague Dawley frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *ARS Pharmaceutica.* 2010; 51:155-162.

13. Arencibia, D.F., Vidal, A., Rosario, L.A., Suárez, Y.E. Respuesta de ratas Sprague Dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica. *Retel*. 2010; 30:21-35.
14. CCAC. 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, 1997, pp.155-162.
15. Díaz, S., González, I., González, R., Coll, F. Evaluación antigenotóxica in vivo de un análogo de brasinosteroides. *Rev Cub Farm*. 2008; 42:75-76.
16. Domínguez, Y., Friman, M. Montaje y estandarización de la técnica de Micronúcleos Trasplacentarios. I Taller Latinoamericano sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. *X Congreso Latinoamericano de Toxicología*, 2000, pp.48-53.
17. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substances (7101). *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. United States Government Printing Office Editions. Health Effects Test Guidelines Washington, 1998, pp.1-15.
18. Fraga, J.R., Domínguez, Y., Friman, M., González, S.B., Somoza, A.D., Pérez, C. Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirósica vax-SPIRAL® empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. *Anuar Toxicol*. 2001; 1:35-39.
19. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T. *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res*. 1994; 312:293-304.
20. Martínez, G., Giuliani, A., León, O.S., Pérez, G., Núñez, A.J. Effect of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytotherapy Research*. 2001; 15:581-585.
21. OECD. Genetic Toxicology: *In vivo Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, in bone marrow cells TG 474* (Annual Report 2009). OECD online Bookshop Editions. Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France, 2009, pp.7-123.
22. OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OECD TG 475 (Genetic Toxicology: *In vivo Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells*). Anexo B11; USA, 1997, pp.5-6.
23. Porter, A., Singh, G. Trasplacentar teratogenesis and mutagenesis in mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Teratog, Carcinog, and Mutag*. 1998; 8:191-203.
24. Prieto, G., Errecalde, C., Trotti, N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet*. 1999; 19:1-8.
25. Rezvanfar, M.A., Sadrkhanlou, R.A., Ahmadi, A. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human & Exp Toxicol*. 2008; 27:901-910.
26. Rodriguez, M.D., Gonzalez, J.E., Aleman, C. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42:1977-1985.

