

Evaluación Genotóxica del Bioplant mediante el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica de Ratón

Giselle PÉREZ MACHADO ¹, Osaida SAÍNZ SUÁREZ ^{2*} & Jorge I. GONZÁLEZ BORROTO ²

¹ Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5 ^{1/2}. Santa Clara Villa Clara. Cuba.

² Unidad de Toxicología Experimental. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruíz de Zárate Ruíz". Apdo 860. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN. Se evaluó mediante la técnica de tinción ultravital con naranja de acridina el potencial del producto Bioplant para inducir reticulocitos micronucleados (RETsMN) en sangre periférica de ratones machos de la línea Cenp:NMRI. La sustancia se disolvió en agua destilada estéril, las dosis ensayadas fueron 0,5, 1 y 2 g/kg de peso corporal (pc) y se administró por vía oral en dosis única en un volumen de 10 mL/kg pc para todos los grupos de tratamiento. La frecuencia de RETsMN se evaluó a las 48 h y 72 h post-administración. Se encontraron diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0,05$ en el número de RETsMN en el grupo de tratamiento con Bioplant a la dosis de 2 g/kg de p.c. en relación con el control con vehículo a las 48 h; además hubo una relación dosis-respuesta positiva, lo que permite concluir que la sustancia de ensayo mostró clastogenicidad en las condiciones de este experimento.

SUMMARY. "Genotoxic evaluation of Bioplant by means of the micronuclei assay in peripheral blood of male mice". The potential of Bioplant was assessed using ultravital staining technique with acridine orange to induce micronucleated reticulocytes (MNRETs) in peripheral blood of male Cenp: NMRI mice. The substance was dissolved in sterile distilled water; the assay doses were 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight (BW) and were administered in single dose of 10 mL/kg (BW) for all the groups. The MNRETs rate was assessed at 48 h and 72 h post-administration. Significant statistical differences were found ($p \leq 0.05$) in the number of MNRETs in the group treated with Bioplant, 2.0 g/kg (BW), related to the control with excipient at 48 h. A positive dose-response relation was obtained; thus, we concluded that the test substance showed clastogenicity under the conditions this experiment. was carried on.

INTRODUCCION

Entre los sistemas clave con mamíferos *in vivo* para detectar aberraciones cromosómicas se encuentra la prueba de micronúcleos, la que mide el potencial de una sustancia para inducir roturas cromosómicas o retrasos en la migración de los cromosomas por alteraciones del huso mitótico ¹. Los micronúcleos se determinan fundamentalmente en eritrocitos policromáticos en médula ósea de roedores adultos expuestos a la sustancia de ensayo por las vías apropiadas.

Para mejorar la observación de los micronúcleos, en 1990 Hayashi ² propuso un método de detección de micronúcleos (MN) en reticulocitos de sangre periférica de ratones mediante la tinción con naranja de acridina (NA). Este ensayo

mostró resultados equivalentes en sensibilidad al método convencional que evalúa células de médula ósea de roedores, así como exhibió ventajas sobre el mismo, desde el punto de vista económico y ético, al lograr reducir el número de animales y refinar el procedimiento experimental, por lo que fue aceptado desde 1996 como ensayo de elección para determinar el potencial genotóxico de sustancias químicas ³⁻⁵.

El Bioplant es un producto de origen natural, sólido, en forma de polvo de color carmelita y es utilizado como fertilizante en los cultivos de tomate, cebolla, ajo, pepino, habichuela, plátano, flores y arroz, aplicándose al suelo; al mismo se le atribuye la propiedad de aumentar el rendimiento y la calidad de las cosechas.

PALBRAS CLAVE: Bioplant, RETsMN, Genotoxicidad.

KEY WORDS: Bioplant, MNRETs, Genotoxicity.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

Teniendo en cuenta la posibilidad de exposición del hombre a este producto, ya sea durante su producción, transporte, manipulación, aplicación o incorporación en la alimentación, así como el efecto que pudiera tener sobre el ecosistema, consideramos importante contribuir a establecer los márgenes de seguridad en el uso de dicha sustancia.

Ese riesgo se evaluó a través de un ensayo genotoxicológico *in vivo* que detecta el potencial del Bioplant de inducir reticulocitos micronucleados (RETsMN) en sangre periférica de ratones de la línea Cenp:NMRI, según los procedimientos y la metodología descrita por Hayashi y el grupo de estudio colaborativo para el ensayo de micronúcleos en Japón (CSGMT) ².

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron 30 ratones machos heteroxénicos de la línea Cenp:NMRI, dada su baja incidencia espontánea de RETsMN, alta sensibilidad a mutágenos clastógenos, y por contar con una amplia base de datos históricos ⁵; el uso de un solo sexo se debe a que el ensayo de micronúcleos en sangre periférica está validado solamente en ratones machos ⁶ y a no ser que haya marcadas diferencias en la toxicidad o metabolismo entre ambos sexos el uso de machos es suficiente para el ensayo de micronúcleos ⁷. Los animales (8-12 semanas de edad y peso entre los 25 y 30 g), fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Se mantuvieron a una temperatura de 21 ± 2 °C, humedad relativa entre un 40-70%, intensidad luminosa entre 200-250 Lux y ciclos de luz/oscuridad 12/12 horas ⁸. Los animales se alojaron en cajas de policarbonato modelo T-2, con encamado de bagazo de caña procesado y esterilizado; recibieron dieta comercial EMO 1001 (Alyco) para roedores, suministrada por el CENPALAB y agua de la pila apta para el consumo humano. Tanto la dieta y como el agua fueron esterilizados y el acceso a los mismos fue *ad libitum*. Los animales se mantuvieron durante 10 días en cuarentena en las mismas condiciones ambientales que durante el ensayo.

Todos los animales se identificaron individualmente mediante tatuajes en las orejas siguiendo un código numérico. Las cajas se identificaron por tarjetas en las que se registró la siguiente información: total de animales por caja, sexo, número de los animales, especie, línea, fecha de administración y de toma de muestras.

Sustancias de control

Control positivo

Se utilizó ciclofosfamida (Asta Médica AG, Frankfurt, lote 035061), administrada en dosis única de 40 mg/kg de peso corporal (p.c.) en un volumen de 10 mL/kg con ayuda de cánula para administración oral. Como disolvente se utilizó agua destilada estéril (condiciones de almacenamiento: 10 °C).

Control con vehículo

La sustancia de ensayo se disolvió en agua destilada, por tanto esta se utilizó como vehículo control.

Soluciones de ensayo

El Bioplant se se disolvió en agua destilada y se administró por vía oral en dosis única en un volumen de 10 mL/kg p.c. Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de la administración a los animales de ensayo. Se prepararon tres dosis: alta media y baja, conteniendo 2 g/kg p.c., 1,0 g/kg p.c y 0,5 g/kg p.c, respectivamente.

Para la selección de las dosis se tomó en consideración que el producto de ensayo está compuesto fundamentalmente por hormonas de origen natural y que en estudios previos de toxicidad aguda por vía oral (Dosis Límite) realizado en ratones, no mostró efectos tóxicos ⁹. Se siguieron los criterios establecidos para seleccionar las dosis de sustancias sólidas no tóxicas, eligiendo para nuestro estudio tres niveles de dosis, una dosis máxima de 2,0 g/kg p.c. y dos niveles de dosis inferiores que se corresponden con 1/2 y un 1/4 de la dosis máxima ¹⁰.

Ensayo de micronúcleos

Una vez finalizada la cuarentena, los animales se asignaron aleatoriamente en número de cinco animales por grupo de tratamiento.

- Grupo I: Control Positivo
- Grupo II: Sin Tratamiento
- Grupo III: Control con Vehículo
- Grupo IV: Dosis Alta de Bioplant (2,0 g/kg p.c.)
- Grupo V: Dosis Media de Bioplant (1,0 g/kg p.c.)
- Grupo VI: Dosis Baja de Bioplant (0,5 g/kg p.c.)

Se tomaron muestras de sangre a las 48 y 72 h post-administración a los animales de todos

los grupos de tratamiento, exceptuando los del grupo control positivo, de los que sólo se tomaron muestras a las 48 h.

La preparación de las láminas, toma de las muestras y tinción se realizaron acorde a la técnica descrita por Hayashi *et al.*². Se montaron dos láminas por animal y se codificaron de forma tal que se garantizara la lectura a ciegas de las mismas. Se contaron 1000 reticulocitos por lámina (2000 por animal), registrándose los RETsMN.

La observación se hizo en un microscopio OLYMPUS de fluorescencia (Modelo BHF) con la combinación de un filtro azul excitador de 480 nm y un filtro barrera amarillo-naranja 515 nm. Se evaluó con un aumento total de 400x.

El potencial de inducción de RETsMN se determinó comparando la frecuencia de RETsMN de los grupos con tratamiento respecto a la del control con vehículo usando ANOVA de un factor, paramétrico y no paramétrico. La relación dosis-respuesta se analizó por medio de una prueba de tendencia lineal. El análisis estadísti-

co se realizó haciendo uso del paquete estadístico SPSS versión 6.1.3. La respuesta se consideró positiva para valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todos los animales concluyeron el estudio vivos y en buen estado de salud; por lo que se pudo evaluar toda la población correspondiente a las diferentes dosis.

El porcentaje de RETsMN a las 48 h en el grupo II (frecuencia espontánea), fue de 0,21%; dicho valor se encuentra dentro el rango reportado para animales no tratados de la especie y línea NMRI^{11,12}.

El porcentaje de RETsMN para el control positivo fue de 3,2%, el cual mostró un incremento con significación estadística respecto al control con vehículo; este último osciló en un rango de 0-2 RETsMN/1000 reticulocitos con una media de 1,4 RETsMN/1000 reticulocitos (0.14%), cumpliéndose con otros de los criterios de validez del ensayo (Tabla 1).

GRUPO	Porc.(%) RETsMN 48 h	p	Porc.(%) RETsMN 72 h	p
Control positivo	3,2	0,00**	-	-
Control sin tratamiento	0,21	0,19	0,13	0,29
Control con vehículo	0,14	-	0,15	-
Bioplant 2 g/kg	0,27	0,012*	0,21	0,42
Bioplant 1 g/kg	0,2	0,08	0,2	0,08
Bioplant 0,5 g/kg	0,14	1,00	0,12	1,00

Tabla 1. Porcentaje de RETsMN en los animales tratados con Bioplant por vía oral.

* Significación estadística para $p \leq 0,05$.

Al compararse los grupos de tratamiento en relación con el vehículo, se apreció que a las 48 h la dosis alta mostró un incremento con significación estadística ($p = 0,012$). Esta diferencia se cumplió para las variables: frecuencia, logaritmo de la frecuencia y los valores transformados del porcentaje. La relación entre la dosis y la respuesta tuvo un carácter lineal, lo que hace que se cumplan las condiciones para considerar la respuesta positiva.

Podemos plantear que la sustancia de ensayo Bioplant administrada por vía oral a ratones

de la línea Cenp: NMRI indujo clastogenicidad a la dosis de 2,0 g/kg p.c. en las condiciones de este estudio, por lo que recomendamos realizarle a la sustancia de ensayo otras evaluaciones genotóxicas que detecten aberraciones cromosómicas, así como otra categoría de daño al material genético y si los niveles de exposición del producto de ensayo para el ser humano superan los 2,0 g/kg de peso corporal se debe monitorear la población en función de la relación dosis-respuesta observada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Schmid, W. (1976) "The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis", en: "*Chemical Mutagens*" (A. Hollaender, ed). Plenum Press, New York, Vol. 4: 31- 53
2. Hayashi M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni & M. Ishidate (1990) *Mut. Res.* **245**: 245-9
3. Hayashi M., Y. Kodama, T. Awogi, T. Susuki, A. Asita & T. Sofuni (1992) *Mut. Res.* **278**: 209-13
4. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992) *Mut. Res.* **278**: 83-98
5. FDA (1996) International Conference on Harmonization; Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals, Availability; Notice. Federal Register: April 24: Volume 61, number 80
6. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1986) *Mut. Res.* **172**:151-63
7. ICH International Conference on Harmonization (1995) Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. July 19, 1995
8. National Research Council (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Ed. National Academic Press. Washington. DC, USA. Págs 21- 55
9. Pérez Gema, G. Martínez, O.S. León, N. Garcés, I. González & B. Sosa (1998) Estudios Toxicológicos del Bioplant. (Informe). Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana. Cuba
10. Xu, J, K.E. Farrar, M. Nguyen, W. Puig & K. Shore (1996) "In vivo evaluation of G-1 for induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow cells". Sitek study No. 0415-1521. Sitek Research Laboratories. Maryland. USA
11. Carballo, N., A. Remigio & G. Pérez (1997) "Evaluación del G-1 por medio del Ensayo de Micronúcleo en médula ósea de ratones Cenp:NMRI". (Informe). Centro de Toxicología Experimental. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. La Habana. Cuba
12. Carballo, N. (1994) "Selección de un Biomodelo para Ensayos de Genotoxicidad". 3ra. Reunión Anual Científico Técnica sobre Animales de Laboratorio. (Informe). Octubre. Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio. La Habana. Cuba