

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.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{}, Yanet Rodríguez^{**}, Yanet Martín^{**}, Daiyana Díaz Rivero^{*}.**

^{*}Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

^{**}Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Email:
darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

El estudio del potencial genotóxico de nuevos compuestos propuestos como fármacos constituye una vía para la determinación del riesgo de daño genético en las personas expuestas. En este sentido la toxicología genética tiene la responsabilidad de determinar las sustancias que pueden ser potencialmente genotóxicas para el hombre, el cual posteriormente evaluará su uso o no, en función de la relación riesgo-beneficio. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas. Por su parte el ensayo de micronúcleos de médula ósea, es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por numerosas agencias reguladoras, es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea. Este sistema permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas. En este artículo se reporta la concentración de espermatozoides, la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides en epidídimos de ratones Balb-C y OF-1 machos y la frecuencia basal de micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1 de ambos sexos; así como la frecuencia inducida de eventos en ambos ensayos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.

Palabras clave: Espontánea, inducida, morfología de la cabeza del espermatozoides, ensayo de micronúcleos, ratones Balb-C, ratones OF-1, ciclofosfamida.

Abstract***Spontaneous and induced frequency of anomalies in the head sperm morphology and micronuclei in bone marrow of Balb-C and OF-1 mice.***

The genotoxic potential study of new compounds to propose as drugs constitutes a route for the determination of the risk of genetic damage in people exposed. In this sense the genetic toxicology has the responsibility of determining the substances that can be genotoxics potentially for the man, the one which later on will evaluate its use or not, in function of the relationship risk-benefit. Among the systems that are used to evaluate the damages happened in the germinal cells is the assays based on the Wyrobek and Bruce morphology approaches, that which allows the study and classification of the head sperms morphology when including inside the classifications, normal, abnormal heads and inside this last banana form morphology, amorphous, without hook and two tail. On the other hand the micronuclei assay in bone marrow, is one of those included at the moment inside the toxicologics battery of obligatory studies demanded by numerous regulatory agencies, it is easily to reproduce and it offers clear information on the cellular proliferation in bone marrow. This system allows registering *in vivo* the capacity of the chemical substances to induce chromosomics ruptures to interfere or the chromosomes metaphases migration during the mitosis of the somatic cells. In this article we reported the sperms concentration, basal frequency of appearance of anomalies in the head sperms in epididymis of Balb-C and OF-1 mice, and the basal frequency of micronuclei in bone marrow of Balb-C and OF-1 mice of both sexes; as well as the events induced frequency in both assays after the cyclophosphamide administration by intraperitoneal route (50 mg/kg), mutagen reference used as positive control.

Key words: Spontaneous, induced, head sperms morphology, micronuclei assay, Balb-C mice, OF-1 mice, cyclophosphamide.

Introducción

El estudio del potencial genotóxico de nuevos compuestos propuestos como fármacos constituye una vía para la determinación del riesgo de daño genético en las personas expuestas. En este sentido la Toxicología Genética tiene la responsabilidad de determinar las sustancias que pueden ser potencialmente genotóxicas para el hombre, el cual posteriormente evaluará su uso o no, en función de la relación riesgo-beneficio.

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno.^{1,2} Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer.^{3, 4}

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad. La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo / beneficio los declare indeseables para la sociedad.^{4, 5}

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre.^{4, 6} En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante.⁷

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas el cual en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo.⁸ Esta técnica a su vez es sensible, rápida y económica lo cual justifica su uso. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoides al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas.⁹

Por su parte el ensayo de micronúcleos de médula ósea, es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH),^{10,11} es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.^{11,12} Este sistema permite registrar in vivo la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o

interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.¹²

En este artículo se reporta la concentración de espermatozoides, la frecuencia basal de aparición de anomalías en la cabeza del espermatozoides de epidídimos de ratones Balb-C y OF-1 machos y la frecuencia basal de micronúcleos de médula ósea de ratones Balb-C y OF-1 de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos en ambos ensayos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.¹³

Materiales y Métodos

- Animales.

Para el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se utilizaron ratones Balb-C y OF-1 machos, en el ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratón se utilizaron ratones Balb-C y OF-1 de ambos sexos, para el caso de los machos se utilizaron los mismos animales para ambos ensayos. En ambos ensayos se utilizaron ratones adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba.

- Administración y dosificación. Ver Tabla 1

- Grupos experimentales incluidos.

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 A.M. y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del

aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratones/grupo) en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoides y en el de micronúcleos de médula ósea de ratón se utilizaron (5 ratones/grupo/sexo), en cada una de las tres series realizadas para un total de 30 ratones/grupo.

1. En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón).¹³
2. En el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2%, el cual es un vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo,¹⁴⁻¹⁶ administrado por vía oral durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón),¹³ preparado 2 horas antes de la administración.
3. En el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9%, ya que esta demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar,^{17, 18} administrado por vía oral durante un periodo de 35 días (duración del ciclo espermático del ratón),¹³ preparado 2 horas antes de la administración.
4. En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF a una dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal, Ciclofosfamida: n,n-bis-(-cloruro de etilo)-n´, o-esterdiamida del ácido fosfórico propinel (C₁₇H₁₅C₁₂N₂O₅P) fue adquirida a la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9%.¹⁹ La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales durante 5 días consecutivos y luego se dejó de administrar durante 35 días (tiempo de reposo, el cual coincide con la duración del ciclo espermático del ratón), para el caso de las

hembras administradas con el control positivo este fue suministrado 48 y 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita.²⁰

Debemos destacar que como ambos ensayos se realizaron juntos utilizando los mismos animales machos para ambos el tiempo de exposición tanto para hembras como para machos fue de 35 días, para de esta forma lograr una reducción de animales en este estudio, y que las células de la médula ósea estuvieran expuestas a las sustancias de ensayo por un periodo relativamente largo para de existir genotoxicidad y citotoxicidad se manifestaran de forma clara y precisa.

- **Observaciones clínicas.**

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

- **Sacrificio.**

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en previa atmósfera de éter, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 horas después de la última administración pasados los 35 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, el sacrificio se realizó 24 horas después de concluido los 35 días sin administrar, para que de esta forma los espermatozoides a analizar fuesen los que estuvieron expuestos al mutágeno, y las hembras tratada con CF fueron sacrificadas 24 horas posteriores a la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.²⁰

- Exámenes realizados.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Una vez sacrificado los animales se realizó la extracción de ambos epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos mediante unas tijeras y fueron depositados en placas Petri que contenían 3 mL de solución isotónica de NaCl 0,9 %. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur.

Conteo de espermatozoides.

El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25 %, transcurridos cinco minutos se le añadió 2 mL más de NaCl 0,9 %, quedando como volumen final 5 ml, luego se realizó una dilución del homogenato tripsinizado en NaCl - Formol al 1 % (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2.^{21, 22}

Morfología del espermatozoide.

Al tubo que contenía la dilución del homogenato ya diluido se le añadió cinco gotas de eosina al 1 %, dejándolo reposar por cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto. Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides, las observaciones fueron realizadas por tres observadores independientes para luego establecer un promedio entre los tres, las mismas fueron realizadas "a ciegas". El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana y sin gancho, así como espermatozoides con dos colas.^{21, 23}

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 3 ml de suero bovino fetal. La médula así obtenida 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 posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas".

Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos.²⁴ 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.

Análisis estadístico

En el caso del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoides se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene). Por lo cual todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación, establecido fue α 0.05. En el ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratón la frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El número total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado. El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0.05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y Discusión

En ninguna de las series experimentales tanto en los grupos control negativo como en los grupos tratados con las sustancias solventes 1 y 2 en los dos estudios y en ambos sexos se encontraron animales con signos clínicos indicativos de toxicidad, resultados similares se obtuvieron en el grupo de CF igualmente en ambos sexos. (Ver Tabla 2 y 3)

Tal como se puede observar en la (Tabla 2 y 3), el tratamiento con Tween 65 al 2% y NaCl al 0,9 % no indujo diferencias significativas al ser comparados con el control negativo en cuanto a la concentración espermática en ambas líneas de ratones, tales sustancias se comportan similarmente a dicho control negativo en las tres series evaluadas, afirmando que en nuestro caso y por resultados dados por diversos autores en ratones Balb-C y OF-1,^{8,13} estos valores constituyen los rangos de frecuencia espontánea en que se mueve la concentración espermática en estas dos líneas de ratones, a su vez pudimos llegar a la conclusión de que estas sustancias utilizadas como solvente no afectaron la proliferación de células germinales, no observándose tendencia a modificar este indicador.

A diferencia de lo observado en los grupos tratados con las sustancias vehículo 1 y 2, la CF si indujo una disminución de la concentración de espermatozoides en ambas líneas, tales resultados concuerda con los obtenidos en el uso de este mutágeno por nosotros y otros autores en ensayos realizados con ratas *SD* y ratones OF-1,^{8,13,25} dados por resultados inducidos por sustancias altamente mutagénicas como la CF, ya que sus metabolitos logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo la producción y maduración de estas.^{13,25-27}

A su vez estos resultados nos permiten afirmar que se podría introducir la línea Balb-C a ser utilizada en este ensayo con mayor frecuencia ya que presenta una

concentración como promedio mayor a la de los OF-1 por tanto aumentaría la facilidad para detectar sustancias mutagénicas que en su mecanismo de acción disminuyen la concentración espermática.

En cuanto a la morfología de la cabeza del espermatozoides resultados observados en la (Tabla 3 y 4), analizando la semejanza entre las medias y la no diferencia significativa existente entre el control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en ambas líneas, en cuanto al número de cabezas anómalas y sus clasificaciones, aparejado a la n analizada tan amplia (15 000 células), podemos afirmar que el rango de cabezas anómalas en los espermatozoides de ratones Balb-C se encuentra en el rango entre 10,7-19,1 y en los OF-1 se encuentra entre 23,8-27,2 bajo nuestras condiciones experimentales en conteo de 500 espermatozoides totales, datos que concuerdan con los hallados por Piña y Aubele tras resultados obtenidos en sus investigaciones en el año 2005 con el uso de este ensayo en ratones NMRI y OF-1.^{28,29} El tratamiento con CF, por su parte, indujo un incremento significativo de las formas anómalas de la morfología de la cabeza del espermatozoide, tal y como esta descrita para este mutágeno destacándose su mayor efecto en la línea Balb-C en la cual indujo 101,3 espermatozoide anormales como promedio de un total de 500 espermatozoides analizados como promedio, resultado que corrobora su uso como compuesto citotóxico y genotóxico en este modelo,^{9,30,31} a la par que valida la conducción de este ensayo bajo nuestras condiciones experimentales.

En cuanto al ensayo de micronúcleos en médula ósea siendo observados los resultados en las Tablas de la 6 a la 9, se puede apreciar que en ambas líneas no existen diferencias significativas en cuanto al índice de citotoxicidad dado por la relación EP/EN indicador de la proliferación celular en médula ósea, la cual es similar tanto en el control como en las sustancias vehículo 1 y 2, las células continuaban su fase normal de diferenciación, proliferación y maduración en la médula ósea, de esta

misma forma se comportó el índice de genotoxicidad (MN-EP %) en ambas líneas, el cual no fue modificado con la administración de las sustancias vehículo 1 y 2 obteniéndose resultados similares a los animales controles.^{32,33} Además se pudo constatar que la línea de ratones Balb-C es más eficiente genéticamente para ser llevada a cabo su uso en este ensayo ya que presenta un porcentaje (%) de eritrocitos policromáticos (EP) espontáneos con micronúcleos más bajo que la línea OF-1 tal como se puede apreciar en las Tablas 6 y 7.

No siendo así para la CF la cual modificó de forma desfavorable ambos indicadores, al realizar su efecto clastogénico y citotóxico aumentando la formación de micronúcleos y favoreciendo que se formen los llamados retardos anafásicos llegando a obtener valores de hasta 1,89 % de EP con micronúcleos.³⁴ De igual forma se demostró que la línea de ratones OF-1 es más susceptible a la CF que la línea Balb-C, dado por tener igualmente la línea OF-1 mayor % de EP portadores de micronúcleos de forma espontánea que la línea Balb-C.

El número de EP con 1, 2 o más micronúcleos también fue similar en los grupos tratados con las sustancias vehículos 1 y 2 al compararlos con los animales controles los cuales se encuentran en el rango de 19-30 EP con micronúcleos totales como promedio. De igual forma que los parámetros evaluados con anterioridad este indicador de cuan genotóxico pueden llegar a ser las sustancias evaluadas por nosotros fue mayor y significativamente diferente en los animales tratados con CF. El aumento encontrado en el grupo tratado con CF evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada,³⁵ lo cual evidencia lo útil que es este mutágeno como control positivo en este ensayo el cual nos permite evaluar a la CF como un potente agente en la formación de micronúcleos.³⁶ (Ver Figura 1 y 2)

Conclusiones

Se pudo concluir que las líneas de ratones Balb-C y OF-1, constituyen un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos como son los incluidos en este trabajo tales como la concentración espermática en epidídimos, la evaluación de la morfología de la cabeza del espermatozoide, frecuencia de eritrocitos en médula ósea de ratones de ambos sexos (índices de genotoxicidad y citotoxicidad), así como se destacó la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal en ambos ensayos.

Tabla 1. Grupos experimentales en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones Balb-C y OF-1 machos y en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1 de ambos sexos para las tres series, vía gástrica.

Grupos Experimentales	# Total de animales	Sustancia a administrar	Vía de administración	Volumen máximo a administrar ml/kg
¹ Control negativo (Balb-C)	30	No tratado	Oral (Simulacro)	-
² Sustancia vehículo 1 (Balb-C)	30	(Tween 65, al 2%)	Oral	2
³ Sustancia vehículo 2 (Balb-C)	30	(NaCl 0,9%)	Oral	2
	30	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15
⁴ Control positivo (Balb-C)				
¹ Control negativo (OF-1)	30	No tratado	Oral (Simulacro)	-
² Sustancia vehículo 1 (OF-1)	30	(Tween 65, al 2%)	Oral	2
³ Sustancia vehículo 2 (OF-1)	30	(NaCl 0,9%)	Oral	2
	30	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15
⁴ Control positivo (OF-1)				

Tabla 2. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones Balb-C machos.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	30	45,3 ± 2,2	2,27 ± 0,2
Sustancia vehículo 1	30	44,8 ± 3,5	2,24 ± 0,2
Sustancia vehículo 2	30	44,9 ± 1,3	2,25 ± 0,4
Control positivo (CF) ^a	30	16,9 ± 5,3*	0,84 ± 0,5*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

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

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Tabla 3. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer de ratones OF-1 machos.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo	30	43,2 ± 4,4	2,16 ± 0,3
Sustancia vehículo 1	30	42,5 ± 3,1	2,13 ± 0,2
Sustancia vehículo 2	30	43,1 ± 3,8	2,16 ± 0,3
Control positivo (CF) ^a	30	18,3 ± 4,1*	0,92 ± 0,4*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

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

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Tabla 4. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones Balb-C machos.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	30	489,3±5,8	10,7±5,8	6,2±5,7	1,2±1,7	2,0±3,8	0,3±1,5
Sustancia vehículo 1	30	483,2±8,3	16,8±5,9	12,0±1,6	1,7±0,3	2,6±3,1	0,5±0,9
Sustancia vehículo 2	30	480,9±3,2	19,1±3,2	11,3±3,1	2,2±1,5	3,9±2,0	1,7±0,1
Control positivo (CF) ^a	30	398,7±7,4*		38,4±7,5*	22,6±4,2*	30,8±7,3*	9,5±2,3*
			101,3±7,4*				

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

Determinaciones en 500 células/animal.

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

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Tabla 5. Morfología de la cabeza del espermatozoide de ratones OF-1 machos.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control negativo	30	476,2±5,6	23,8±5,6	18,9±4,4	1,3±0,4	3,2±2,5	0,4±0,2
Sustancia vehículo 1	30	474,1±8,4	25,9±8,4	19,4±3,5	1,4±0,8	4,8±5,2	0,3±0,1
Sustancia vehículo 2	30	472,8±11,0	27,2±6,0	19,2±5,5	1,7±3,3	5,9±3,9	0,4±0,1
Control positivo (CF) ^a	30	402,6±11,2*	97,4±11,2*	46,6±8,5*	16,1±4,1*	27,4±8,3*	7,3±1,6*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía i.p.

Determinaciones en 500 células/animal.

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

(X media; DE desviación estándar, para las tres series analizadas).

Tabla 6. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C de ambos sexos.

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
Control negativo	15	1081 ± 13,0	919 ± 13,0	1,18 ± 0,01	0,16 ± 0,03
Sustancia vehículo 1	15	1072 ± 16,6	928 ± 16,6	1,16 ± 0,04	0,18 ± 0,04
Sustancia vehículo 2	15	1087 ± 20,0	917 ± 20,0	1,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04
Control positivo (CF) ^a	15	933 ± 21,3*	1067 ± 21,3*	± 0,87 ± 0,03*	1,82 ± 0,89*
Hembras					
Control negativo	15	1069 ± 14,9	931 ± 14,9	1,15 ± 0,05	0,13 ± 0,04
Sustancia vehículo 1	15	1077 ± 14,6	923 ± 14,6	1,17 ± 0,02	0,14 ± 0,07
Sustancia vehículo 2	15	1086 ± 22,1	914 ± 22,1	1,19 ± 0,04	0,17 ± 0,08
Control positivo (CF) ^a	15	922 ± 19,8*	1078 ± 19,8*	± 0,85 ± 0,02*	1,65 ± 0,77*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series experimentales).

Tabla 7. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1 de ambos sexos.

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
Control negativo	15	1067 ± 12,9	933 ± 12,9	1,14 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Sustancia vehículo 1	15	1076 ± 22,7	924 ± 22,7	1,16 ± 0,04	0,20 ± 0,03
Sustancia vehículo 2	15	1071 ± 25,1	929 ± 25,1	1,15 ± 0,05	0,21 ± 0,05
Control positivo (CF) ^a	15	953 ± 20,5*	1047 ± 20,5*	± 0,91 ± 0,06*	1,89 ± 0,61*
Hembras					
Control negativo	15	1055 ± 11,2	945 ± 11,1	1,12 ± 0,03	0,16 ± 0,05
Sustancia vehículo 1	15	1066 ± 19,5	934 ± 20,2	1,14 ± 0,06	0,18 ± 0,06
Sustancia vehículo 2	15	1062 ± 22,8	938 ± 22,2	1,13 ± 0,05	0,14 ± 0,04
Control positivo (CF) ^a	15	947 ± 18,9*	1053 ± 18,7*	± 0,89 ± 0,02*	1,78 ± 0,58*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 células/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).

(X media; DE desviación estándar, para las tres series experimentales).

Tabla 8. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C de ambos sexos.

Grupo	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
Machos					
Control negativo	15	23	17	5	1
Sustancia vehículo 1	15	26	18	7	1
Sustancia vehículo 2	15	25	15	9	1
Control positivo (CF) ^a	15	258*	153*	84*	21*
Hembras					
Control negativo	15	19	12	6	1
Sustancia vehículo 1	15	20	12	8	0
Sustancia vehículo 2	15	24	18	5	1
Control positivo (CF) ^a	15	233*	141*	73*	19*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 EP/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las tres series experimentales).

Tabla 9. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1 de ambos sexos.

Grupo	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
Machos					
Control negativo	15	26	20	5	1
Sustancia vehículo 1	15	28	19	8	1
Sustancia vehículo 2	15	30	20	9	1
Control positivo (CF) ^a	15	267*	180*	71*	16*
Hembras					
Control negativo	15	22	18	3	1
Sustancia vehículo 1	15	25	17	6	2
Sustancia vehículo 2	15	20	13	6	1
Control positivo (CF) ^a	15	251*	173*	65*	13*

CF (Ciclofosfamida), ^a Administración por vía ip.

Determinaciones en 2 000 EP/animal.

*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las tres series experimentales).

Figura 1. Ratón macho de la línea OF-1



Figura 2. Ratón macho de la línea Balb-C.



Referencias Bibliográficas

1. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar J.N, Poddar G, Nandy A.K. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 534:133-143.
2. Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular mutagenesis* 2003; 41:85-91.
3. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39:119-126.
4. Mortelmans K, Rupa D. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56:379-397.
5. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hipótesis. *Journal Epidemiol* 2000; 134:756-760.
6. Motelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 2000; 455:29-60.
7. García-Peñalver L, Sureiro R.A, Garrido M. J. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en Salmonella typhimurium TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental; 2000.p.109-110.
8. Arencibia D.F, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 2009; 40(1):29-32.
9. Wyrobek AJ. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.

10. Cox S.H, Ann M. Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing. Second Edition, Revised and Expanded. Research Triangle Park, North Carolina; 1999.p.178-179.
11. Schmid W. The micronucleus assay validation. Mutation Research 1975; 24:9-11
12. Alamone M.F. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. Environmental and Molecular Mutagenesis 1994; 23:239-240.
13. Betancourt J, Ramos A, Bizoso A, Decalo M, Martínez MJ, Edreira A. Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa Mill* (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides en ratón. Revista Cubana de Plantas Medicinales 1998; 3:58-61.
14. Arruzazabala M.L, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. Drugs Exp Clin Res 2004; 30:227-234.
15. Arruzazabala M.L, Mas R, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. Drugs R&D 2006; 7:233-241.
16. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. Drugs Exptl Clin Rest 2005; 31:193-198.
17. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer W. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. Arch Androl 2000; 44:147-154.

18. Shayne C.G. Animal Models in toxicology. Chapter 2, The Mouse. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.24-72.
19. Arencibia D.F, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. Revista Cubana de Farmacia 2009; 43(2):8-9.
20. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles T.H, Rodríguez E. Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España; 2006.p.2-3.
21. Wyrobek A.J, Bruce W.R. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection. Second edition, Vol 2, England: United Kingdom edition published; 1978.p.135-136.
22. Kempinas W.G, Lamano-Carvalho T.L. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat caudal epididymidis. Lab. Animals 1998; 22:154-156.
23. Mitchell A.D. Genetic Toxicology Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook.Ed. U.S.A: Gad S.C.; Marcel Dekker, Inc edition; 1999.p.167-168.
24. Hayashi M, Tice R, MacGregor J.T, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Research 1993; 5:120-134.
25. Arencibia D.F, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. 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*. Revista Española de Toxicología 2009; 26(3), en prensa.
26. Fielder R.J, Allen J.A, Boobis A.R, Botham P.A, Doe J, Esdaile D.J. Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose

- setting in "*In Vivo*" Mutagenicity Assays. Genetic Toxicology and Environmental Mutagen 1999; 4(3):313-319.
27. Feron V.J, Groten J.P, Jonker D, Cassee F.R, Van Bladeren P.J. Toxicology of Chemical Mixtures, Chapter 14, In: General and Appl. Toxicology. Toxicology and Air Pollution: Risk Assessment. Univer of Bourgogne; 1998.p.42-45.
28. Piña B, Solís M.J, Quintanilla B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicology and Applied Pharmacology 2005; 202(2):189-198.
29. Aubele M, Jütting U, Rodenacker K, Gais P, Burger G, Hacker-Klom U. Quantitative evaluation of radiation induced changes in sperm morphology and chromatin distribution. Cytometry Part A 2005; 11(5):586-594.
30. Johnson J. Administration backs chemical testing, Genetic Toxicology in germinal cells. Chem Eng News 1998; 76:7-8.
31. Arencibia D.F, Rosario L.A, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. Retel (Revista de Toxicología en Línea) 2009; 20(1):2-14.
32. MacGregor J.T, Tucker J.D, Eastmond D.A, Wyribek A.J. Integration of Cytogenetic Assays With Toxicology Studies. Environ. Mol. Mutag 1995; 25:328-330.
33. Gámez R, Fernández I, Acosta P.C, Alemán C, Rodeiro G, Rodríguez M. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. Rev. CENIC, Ciencias Biológicas 2000; 31(3):211-216.
34. Schmid W. The *in vivo* micronucleus test in mice. Mutat Research 1981; 31:9-15.

35. Mac Gregor J.T, Wehr C.M, Gould D.H. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. Environ Mutagen 1999; 2: 509-514.
36. Heddle J.A, Cimino M.C, Hayashi M, Romagna F, Shelby M.D, Tucker J.D. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present and Future. Environmental and Molecular Mutagenesis 1991; 18: 277-279.

Recibido: 27/10/09

Aceptado: 29/10/09