

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación Mutagénica de las tabletas orales de PV-2 con ensayos in vivo

Yesenia Rivero Salgado, Ailemys Curbelo Valiente, Gladys Pérez Arnáez, Nidia Fernández Esperón, Isidoro Scull Campos, Antonia C. Remigio Montero, Axel Mancebo Rodríguez. Asniel F. García Díaz.

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB. Finca Tirabeque, Carretera Cacahual Km 21/2, Bejucal, La Habana Cuba. Correo yesenia@cenpalab.inf.cu

Resumen

Las tabletas orales PV-2, están realizadas con tintura de la planta *Morinda royoc* L., nombrada comúnmente en nuestro país como "Garañon", lo que confiere efectos estimulantes, vigorizaste y estimulador de la libido. El desarrollo de estos productos tiene necesariamente que llevar en paralelo un sistema evaluativo que permita conocer con certeza el impacto que sobre la salud humana, animal y el medio ambiente puedan ocasionar tales productos naturales. Se realizó el estudio del efecto mutagénico en ratones y ratas mediante los Ensayos de Aberración Cromosómica, Micronúcleos y Espermatozoides administrados por vía oral, empleando como controles positivo la acrilamida (20 mg/kg p.c) y la ciclofosfamida (40 mg/kg p.c), y como control negativo el agua estéril. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y procesado para obtener las preparaciones según el procedimiento. Los resultados demuestran la no evidencia de efectos clastogénicos en la médula ósea de ratón, ni efecto mutagénico sobre los cromosomas de la médula ósea de las ratas. No mostró tampoco efectos genotóxicos ni citotóxicos sobre las células espermáticas del ratón. Estos resultados amplían los conocimientos sobre la inocuidad de este producto en su relación con el hombre.

Palabras claves: Ciclofosfamida, Acrilamida, morfología espermatozoides, Análisis citogenético, Micronúcleos ratón, genotoxicidad

Abstract

Mutagenic evaluation of the oral pills of PV-2 with *in vivo* assays

The oral pills PV-2 are prepared with dye of the plant *Morinda royoc* L., commonly named in our country like " Garañón (stud) "; what confers stimulant invigorating and stimulative effects on the libido. The development of these products has to carry out in parallel an evaluative system that allows knowing with certainty the impact that such biotechnical products have on human health, animal and the environment. It was carried out the study of the mutagenic effect in mice and rats by means of chromosomal aberration, micronucleus and sperm assays, administered by oral via, using as positive controls the acrylamide (20 mg/kg b.w), cyclophosphamide (40 mg/kg p.c) and as negative control sterile water. At the end of the treatment, the animals were sacrificed and processed to obtain the preparations according to the procedure. The results proved the non-evidence of neither clastogenic effects in mouse's bone marrow, neither mutagenic effect on the chromosomes of rat's bone marrow. There were not either genotoxic effects or cytotoxic ones on the spermatic cells of the mouse. These results extend the knowledge on the innocuousness of these products in their relationship to the human being.

Keywords: Cyclophosphamide, Acrylamide, sperm morphology, cytogenetic analysis, Micronucleus mouse, genotoxicity

Introducción

Hace algunas décadas, se conoce la existencia de mutágenos químicos así como los posibles efectos adversos que ejercen estos sobre el material genético, es por ello que se hace cada día más necesario el conocimiento de las sustancias químicas y farmacéuticas de su uso cotidiano.

El desarrollo de estos productos tiene necesariamente que llevar en paralelo un sistema evaluativo que permita conocer con certeza el impacto que sobre la salud humana, animal y el medio ambiente puedan ocasionar tales productos biotecnológicos.

La actividad genotóxica de muchas sustancias ha sido típicamente valorada mediante la ejecución de una batería de pruebas *in vivo* e *in vitro* usando diferentes organismos. Estos sistemas de pruebas de la Genética Toxicológica son componentes de los experimentos de carcinogénesis y riesgo genético.

Las tabletas orales PV-2, están realizadas con tintura de la planta *Morinda royoc* L., nombrada comúnmente en nuestro país como "Garañon", presenta efectos estimulantes, vigorizaste y estimulador de la libido, este ultimo aspecto basado fundamentalmente en el uso y efectos conocidos tradicionalmente en nuestro país. Actualmente se promueve y se comercializa en mas de 15 piases como suplemento alimenticio, para la tercera edad, por tal razón el objetivo principal de nuestro trabajo es evaluar el potencial genotóxico de este compuesto mediante la ejecución de tres ensayos *in vivo*, para su posterior registro, comercialización y aplicación en nuestras redes de salud.

Materiales y Métodos

Animal

Se utilizaron ratones de la línea Cenp:NMRI que se encontraban entre 8 y 12 semanas de edad, con un rango de peso corporal entre 27 y 30 g, y ratas de la línea Cenp:SPRD, con un rango de peso corporal de 200 ± 20 g suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo y aleatorizados para ser tratados en grupos de 5 animales por sexo con el solvente o con los compuestos a evaluar.

Parte experimental.

Las pruebas se ejecutaron siguiendo las líneas directivas de la OECD 1997¹, para los Ensayos de Genotoxicidad y cumplimentando el Código de Buenas Prácticas de Laboratorio para la Toxicología Experimental del CETEX², conformándose 3 grupos experimentales para cada ensayo.

Grupo 1: Grupo control negativo (agua estéril). Vía oral.

Grupo 2: Grupo control positivo (Ciclofosfamida, 40 mg/kg de p.c. para Micronúcleos y Aberraciones Cromosómicas) y (Acrilamida, 20 mg/kg para Espermatozoides). Vía intraperitoneal.

Grupo 3: Grupo tratado con PV-2 (2000 mg/kg de p.c). Vía oral.

Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea del ratón.

Los compuestos y el solvente fueron aplicados siguiendo el mismo esquema de tratamiento, consistente en 2 administraciones separadas entre sí por 24 horas y sacrificio de un solo tiempo, a las 24 horas de la segunda aplicación (tratamiento subagudo). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de la médula ósea, fue descrito por Schmid en 1976³ y continua utilizándose de igual forma. Con este procedimiento se

obtiene una tinción diferencial entre los eritrocitos policromáticos (PCE) y los eritrocitos normocromáticos (NCE), a partir de la cual se cuantifica el número de PCE portadores de micronúcleos (MN) y se expresa en porcentaje de PCE/MN con respecto al total de PCE observados, (1000 por animal), (Índice de Genotoxicidad).

Se valora además la proporción PCE/NCE como estimador de toxicidad sobre la hematopoyesis, para ello se cuantificaron los NCE presentes hasta el conteo de 250 PCE en cada lámina (Índice de Toxicidad). Para el procesamiento estadístico de los datos, de ambos índices (Genotoxicidad y Toxicidad) de los compuestos PV-2, y sus respectivos controles; negativo y positivo, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) Factorial (considerando dosis y sexo) de efectos fijos y la prueba de Dunnet de una cola

Los criterios de genotoxicidad tomados fueron los recomendados por Hayashi y col. en 1994⁴ significación estadística del incremento del % PCE-MN en una dosis con respecto al control negativo.

Como criterio de toxicidad se tomó igualmente el sugerido por Hayashi y col. en 1994⁴ significación estadística de la disminución de la proporción PCE/NCE en una dosis con respecto al control negativo.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón.

Los animales fueron tratados siguiendo el mismo esquema de tratamiento, el cual consiste en cinco aplicaciones separadas entre sí por 24 horas y sacrificio a los 35 días de la primera administración.

El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de los epidídimos, fue siguiendo la metodología propuesta por Wyrobek y Bruce en 1975⁵.

A los 35 días de iniciado el tratamiento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, procediéndose a la extracción de la cola del epidídimo, la cual fue fragmentada en 1 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0.9% para la obtención de la suspensión espermática. Esta suspensión se filtró a través de gasa para eliminar los restos de tejidos; del líquido filtrado se tomaron 0.5 mL y se le añadieron 50 µL de Eosina al 1% y

se dejó reposar por 15 minutos. Se realizaron dos frotis por animal y se analizaron 500 espermatozoides por lámina (1000 x animal), para determinar el por ciento de anomalías. El criterio de clasificación seguido fue el planteado por Wyrobek y Bruce 1975⁵ basado en la identificación de cabezas normales, sin gancho, amorfas y bananas.

Los restantes 0.5 mL de la suspensión espermática se utilizaron para determinar el millonaje con ayuda de un hemocitómetro. Todas las observaciones se realizaron en un microscopio Opton con objetivo 100 x.

Para el procesamiento de los datos, se determinó la media y desviación estándar de cada parámetro teniendo en cuenta el grupo de experimentación. Para la comparación entre los grupos se empleó un ANOVA de clasificación simple, con una significación de $p < 0.05$.

Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en médula ósea de rata.

Todas las sustancias fueron aplicadas en una simple dosis y a las 24 horas post-tratamiento, se procedió al sacrificio de las ratas mediante narcosis con éter y dislocación cervical. Dos horas antes del sacrificio, a los animales se les administró por vía intraperitoneal (IP) Colchicina (Inhibidor del ciclo celular) en una dosis de 4 mg/kg de peso corporal (p.c).

Se extrajeron ambos fémures y se colectó la médula ósea de los mismos siguiendo el procedimiento propuesto por Legator y col. en 1969⁶. De esta forma obtenemos células detenidas en etapa de metafase facilitándose la observación del cariotipo de la célula.

Las aberraciones cromosómicas son evaluadas en las primeras mitosis post-tratamiento. La mayoría de los mutágenos inducen aberraciones de tipo cromatídico, aunque también ocurren aberraciones cromosómicas.

Se determina el Índice de Genotoxicidad, al cuantificar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales presentes en 50 metafases por animal.

Entre las aberraciones cromosómicas podemos encontrar:

1. Cromosoma minuto
2. Fragmento
3. Brecha cromatídica y cromosómica
4. Anillos
5. Poliploidías, entre otras.

Para el análisis de los datos obtenidos se emplearon los siguientes métodos estadísticos:

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, no encontrándose una distribución normal para la variable % de aberraciones, por lo que fue necesario utilizar transformaciones de escalas para la misma. Se desarrolló además la prueba de Homogenicidad de Varianza. Para determinar diferencias estadísticas entre grupos se realizó el test de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunnet de una cola.

Resultados y Discusión

Resulta necesario utilizar un control del vehículo o solvente de los compuestos evaluados (control negativo) pues las respuestas tóxicas y genotóxicas de los compuestos, se evidencian en la comparación con los valores de dicho control. El control positivo es una certificación para la aceptación técnica de los experimentos y/o la sensibilidad del ensayo, por lo que estudios con resultados negativos deben incluir como requisito obligatorio para ser aceptado los datos obtenidos en este control.

Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea del ratón.

En la tabla 1 se exponen los resultados. Como se puede apreciar, no se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el Índice de genotoxicidad entre el grupo tratado con PV-2 y el grupo control negativo (agua estéril), lo cual evidencia que el producto no afecta genotóxicamente los eritrocitos de la médula ósea de ratón. El grupo tratado evidenció una disminución significativa de la proporción EPC/ENC. Esta disminución puede interpretarse como indicador de exposición del órgano diana. Esta proporción permite evaluar la toxicidad sistémica para la médula ósea mediante la evaluación de la relación de eritrocitos normocromáticos y policromáticos. A su vez resalta la ausencia de genotoxicidad si se obtiene un resultado negativo en el ensayo de micronúcleos en médula ósea (como ocurre en el presente estudio), cuando es acompañado por la evidencia de distribución hacia el órgano diana⁷.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón.

En la tabla 2 se expone el % de anormalidades y el total de células por mililitros. No se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados con el PV-2 y el grupo control negativo para las diferentes categorías de anormalidades: Amorfo, Sin gancho y Banana, así como para la relación del número total de células por mililitro.

Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en médula ósea de rata.

En la tabla 3 se exponen los resultados obtenidos. Como se puede apreciar, cuando analizamos el número de Aberraciones cromosómicas del producto en la dosis empleada no

se obtuvieron diferencia significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados con el PV-2 y el grupo control negativo (agua estéril), y por el contrario se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo control positivo (Ciclofosfamida) .

Conclusiones

Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea del ratón.

Por todo lo anterior expresado se puede concluir que en las condiciones del ensayo realizado y con el nivel de dosis aplicada, al PV-2 no exhibió efectos genotóxicos sobre la médula ósea del ratón.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón.

Se concluyó que bajo las condiciones en que se realizó el ensayo y el nivel de dosis empleado el PV-2 no produjo efectos genotóxicos sobre las células espermáticas del ratón.

Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en médula ósea de rata.

Con los resultados obtenidos y en las condiciones del ensayo no se detectó efecto mutagénico sobre los cromosomas de la médula ósea de la rata SPRD y por tanto se puede concluir que el PV-2 por vía oral con la dosis aplicada, no posee efectos mutagénicos.

Fig. 1: Observación microscópica de eritrocitos policromáticos(PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE). Micronúcleos (MN).

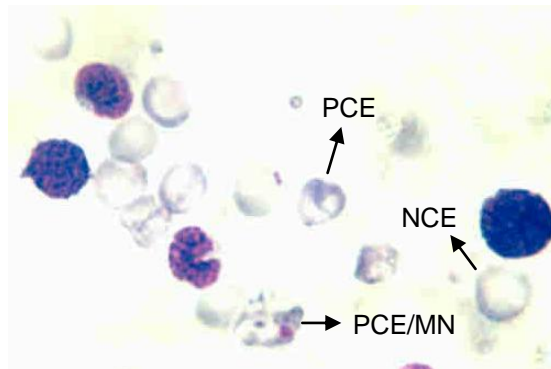
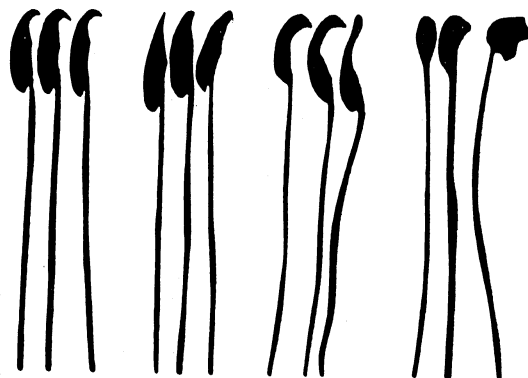


Fig. 2: Clasificación de la morfología de las cabezas de los Espermatozoides de ratón.



Normales Sin gancho Bananas Amorfos

Fig. 3: Célula detenida en metafase. Cariotipo de rata

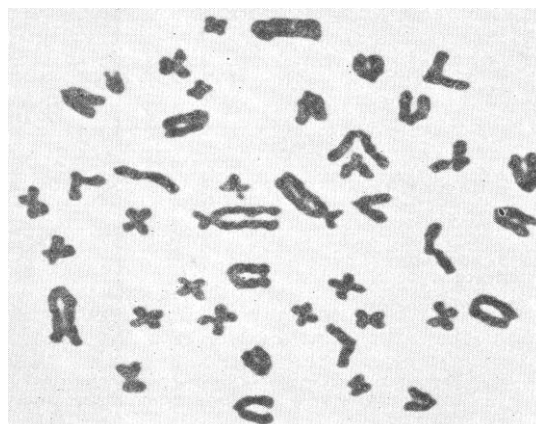


Tabla 1. Valores medios de los Índices de Toxicidad (IT) y Genotoxicidad(IG)

Grupo	n	Total de PCE	IG (MN/PCE) (X ± DE)	IT (PCE/NCE) (X ± DE)
CN	5m	5000	0.06±0.04	2.56±0.07
	5h	5000	0.02±0.04	2.59±0.13
CP	5m	5000	0.42±0.16*	2.52±1.20
	5h	5000	0.42±0.08*	2.07±0.38
PV-2	5m	5000	0.08±0.08	1.40±0.12*
	5h	5000	0.06±0.05	1.64±0.59*

PCE: Eritrocitos policromáticos **X: Media**
NCE: Eritrocitos normocromáticos **G: Grupo**
 MN: micronúcleos DE: Desviación Estándar
 n: número de animales f: femenino
 CN: Control negativo m: masculino
 CP: Control positivo * $p < 0.05$

Tabla 2. Anormalidades y Concentración Espermática (x10⁶ mL).

Grupos	ESPERMATOZOIDES					
	N	SG (X ± DE)	A (X ± DE)	B (X ± DE)	TA (X ± DE)	C (X ± DE)
CN	97.2	1.32 ± 1.64	1.40 ± 1.58	0.02 ± 0.45	2.74 ± 2.41	13.06 ± 1.23
CP	90.8*	3.14 ± 1.13*	5.3 ± 1.48*	0.14 ± 0.11*	8.58 ± 2.16*	10.92 ± 1.34*
PV-2	95.7	2.04 ± 1.52	2.16 ± 2.41	0.06 ± 0.55	4.26 ± 2.70	12.35 ± 1.61

X: Media DE: Desviación Estándar
 CN: Control negativo CP: Control positivo
 N: Normales SG: Sin gancho
A: Amorfos **B: Bananas**
TA: Total de anormales **C: Concentración**
 * $p < 0.05$

Tabla 3 Número de Aberraciones cromosómicas por grupo de tratamiento y sexos combinados.

Grupo	n	Número Células	Aberraciones/Células	Total de aberraciones (X ± DE)
CN	10	500	0.01	0.60 ± 0.48
CP	10	500	0.48*	15.80 ± 3.77*
PV-2	10	500	0.01	0.70 ± 0.82

CN: Control negativo **CP: Control positivo**
 n: Número de animales X: Media
 DE: Desviación estandar * $p < 0.05$

Referencias Bibliográficas

1. OECD. (1997). Organización Económica de Cooperación y Desarrollo. Guidelines for Testing of Chemical. Genetic Toxicology.
2. Código de Buenas Prácticas de Laboratorio (1992). Centro de Toxicología Experimental, CETEX, CENPALAB.
3. Schmid, W. (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis. Chemical mutagens. Ed A. Hollaender. Plenum, New York. 4: 31-53.
4. Hayashi, M.; Tice, R.; McGregor, J.; Romagna, F.; Pacchierotti, F. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304.
5. Wyrobek, A.; Bruce, W. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 72: 4425-4429. 1975.
6. Legator, M. S., Palmer, K. A., Green, S., and Peterson, K. W. Cytogenetic studies in rats of cyclohexalamine, a metabolite of cyclamate. *Science* 165: 1139-1140, 1969.
7. Worth, A. P. and Balls, M.. Alternative (Non-animal) Methods for Chemicals Testing: Current Status and Future Prospects. Chapter 9: *Genotoxicity and Carcinogenicity*. *ATLA*. 30(1): 83-93. 2002

Recibido: 24/02/12

Aceptado: 29/02/12