

Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI

Rafael Gámez Menéndez, Ivonne Salomé Fernández, Caridad Pilar Acosta, Celia Alemán Santago, Idania Rodeiro Guerra, María D. Rodríguez González y Haydee García.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1 de octubre de 1999. Aceptado: 13 de diciembre de 1999.

Palabras clave: micronúcleos, letales dominantes, frecuencia espontánea, ciclofosfamida, ratón NMRI.
Key words: micronucleus, dominant lethal, spontaneous frequency, cyclophosphamide, NMRI mice.

RESUMEN. La línea de ratón NMRI fue desarrollada en el Instituto Naval de Investigaciones Médicas de los Estados Unidos para utilizarla en la investigación sobre enfermedades infecciosas y en el programa inmunológico. En Cuba los ratones de esta línea son suministrados a las instituciones científicas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio de Cuba. Este estudio describe la frecuencia espontánea de la línea para los indicadores de cito y genotoxicidad que se registran en dos ensayos establecidos: micronúcleos en médula ósea de roedores (EMN) y mutaciones letales dominantes (EDL) utilizando los dos sexos. Se relacionan datos obtenidos en diferentes series experimentales, los cuales forman parte de la base de datos histórica del laboratorio de los autores. Además, se reporta la frecuencia de eventos inducida en los dos ensayos por la administración intraperitoneal (ip) de 50 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida, agente antineoplásico utilizado como mutágeno de referencia en estudios genotóxicos *in vivo*. Ambos ensayos (EMN y EDL) detectan el daño originado por aberraciones cromosómicas en células somáticas y germinales respectivamente, inducidas tanto por agentes químicos o físicos a través de similares mecanismos. Son parte de la batería de ensayos recomendados en los estudios preclínicos de nuevas drogas. Los resultados presentados muestran el intervalo de frecuencia espontánea para cada indicador incluido en el estudio. Por otra parte, en los animales tratados con el mutágeno, se registró un aumento de la frecuencia de eritrocitos micronucleados y la disminución del porcentaje de eritrocitos policromáticos en el EMN, así como una reducción del número de implantes y fetos vivos con un aumento del número de reabsorciones tempranas y tardías en el EDL. Las comparaciones realizadas con la frecuencia espontánea evidenció una diferencia significativa. Se pudo concluir que la línea de ratón NMRI, constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos y la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida que muestra.

ABSTRACT. NMRI stock mouse was developed at Naval Medical Research Institute, to be used in the research about infectious diseases and immunological program. This strain has shown to be useful in mutagenesis studies conducted in European Laboratories. In this case, animals were supplied by National Center for Laboratory Animals Production. Data obtained in two genotoxicity assays: Bone marrow micronucleus test and dominant lethal test using non-treated NMRI mice are presented in this paper, which is part of laboratory historic controls. In addition, results obtained in cyclophosphamide treated animals are also shown. Bone marrow micronucleus test and dominant lethal test register chromosomal aberrations in somatic and germ cells respectively, that can be similarly induced by physical and chemical agents. Both assays are recommended for the preclinical evaluation of new drugs. Spontaneous and induced frequencies of each relevant parameter are shown significant differences were detected between control and cyclophosphamide-treated animals. Taking into account our results, the authors concluded that NMRI strain from CENPALAB is suitable to be used in the mentioned genotoxicity test.

INTRODUCCION

El ratón es la especie más recomendada por las guías regulatorias para el ensayo de detección de mutaciones letales dominantes y a su vez, una de las especies propuestas para el ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores.^{1,2} Sin embargo, la gran diversidad de líneas de ratón existentes genera una variabilidad en los resultados de una línea a otra, por lo que se hace necesario determinar tanto la frecuencia basal como la sensibilidad que permitan expresar el daño inducido por el empleo de mutágenos de referencia, para lograr una caracterización de la línea utilizada.³

La ciclosfosfamida, cuyos efectos biológicos dependen de su activación por las enzimas microsómicas hepáticas, es una de las drogas más utilizadas en el tratamiento de varios tipos de enfermedades neoplásicas humanas, dentro de las que se incluyen, linfomas malignos, mielomas múltiples, leucemias, adenocarcinoma ovárico, entre otros y a su vez, es utilizada como agente inmuno-supresor en varias enfermedades no malignas.⁴

Por otra parte, esta droga de referencia es de las más ampliamente empleadas en estudios de mutagenesis *in vivo* como mutágeno indirecto, al ser capaz de producir mutaciones génicas como sustituciones de pares de bases y aberraciones cromosómicas que pueden dar lugar

a la inducción de mutaciones letales dominantes en ratones machos y hembras.⁵

La línea de ratón NMRI fue originalmente desarrollada por el Instituto Naval de Investigaciones Médicas en Maryland, Estados Unidos, con el propósito de utilizarla en un programa de enfermedades infecciosas e inmunológicas. En la actualidad, su utilización es muy frecuente en estudios de mutagenicidad como el de micronúcleos en médula ósea, principalmente en Europa.

En este artículo se reporta la frecuencia basal de aparición de micronúcleos en médula ósea y de mutaciones letales dominantes en ratones NMRI de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos en ambos ensayos, tras la administración de ciclofosfamida por vía intraperitoneal (ip), mutágeno de referencia utilizado como control positivo.

Los datos presentados provienen de diferentes estudios realizados en el laboratorio de los autores, los que constituyen parte de los correspondientes controles históricos para esta línea.

MATERIALES Y METODOS

Series incluidas

Los datos reportados fueron recopilados a partir de estudios con nuevos productos de posible uso humano llevados a cabo de 1994 a 1997 (Tabla 1). Dos de estos estudios han sido ya publicados.^{6,7}

Agente químico

Ciclofosfamida: *N,N*-bis-(cloruro de etilo)-*N'*,*o*-esteridiamida del ácido fosfórico propinol ($C_{17}H_{15}C_2N_3O_5P$) fue adquirida a la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, lote LM081 y se diluyó, para todas las experiencias, en disolución salina (NaCl) al 0,9 %. Se administró inmediatamente después de ser preparada.

Se emplearon como controles de disolvente los animales tratados con

disolución salina (NaCl al 9 %) y goma acacia-agua (10 mg/mL). Este último disolvente ha sido empleado para la preparación de las dosificaciones de productos de origen natural evaluados como en el caso del D-002, una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de elevado peso molecular, con propiedades antiulcerosas, aislada de la cera de abejas.^{6,9}

Animales

Ratones NMRI de ambos性os, adultos jóvenes de 5 a 6 semanas, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), cuyos pesos oscilaban entre 22 y 26 g. El alimento utilizado fue pienso estándar para roedores suministrado por el CENPALAB, así como el acceso al agua fue *ad libitum*. Se mantuvieron desde su arribo al laboratorio en locales con ciclo de luz-oscuridad de 12 h, 20-22 °C y entre 45-55 % de humedad relativa. Estas características fueron comunes para todas las series experimentales en ambos ensayos.

Ensayo de micronúcleos

Dosis, frecuencia y vía de administración

Se realizó una administración única por vía ip de ciclofosfamida 50 mg/kg de peso corporal, utilizando un volumen de 0,2 mL por cada 20 g de peso.

Todos los grupos estaban constituidos por seis animales/sexo.

Los animales pertenecientes al control negativo fueron aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento y se denominaron controles no tratados.

Los animales considerados como controles de vehículo recibieron por vía oral 10 mL/kg peso corporal de goma acacia-agua (10 mg/mL) durante 5 d.

Tiempo de sacrificio

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, 48 h después de la administración única

del producto (animales tratados con ciclofosfamida) y 24 h después de la última administración (controles de vehículo), haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos.

Metodología

Un fémur de cada animal fue extraído y lavado la cavidad medular por flujo con suero bovino fetal. La médula contenida en 3 mL de suero bovino fetal fue centrifugada a 1 000 r/min por 10 min y luego de eliminar el sobrenadante, se realizó un frotis del botón celular en láminas limpias. Las que después de ser montadas, (mínimo: dos/animal), se mantuvieron 24 h a temperatura ambiente para su secado.

Posteriormente, fueron fijadas en metanol absoluto por 5 min previo a la tinción con giemsa al 5 % en agua durante 12 a 15 min. Las láminas fueron codificadas aleatoriamente para que su observación se realizará "a ciegas".

Se contabilizó la proporción de eritrocitos policromáticos (EP) y normocromáticos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (EP-MN) en 2 000 EP/animal. Todas las determinaciones se realizaron paralelamente por dos observadores.

Ensayo de letales dominantes

Dosis, frecuencia y vía de administración

Los tratamientos se aplicaron diariamente durante 5 d consecutivos, tanto a hembras como a machos por vía ip. La ciclofosfamida (50 mg/kg de peso corporal), fue disuelta en disolución salina, utilizando un volumen de 0,2 mL por cada 20 g de peso corporal. El control de vehículo en este caso, estuvo constituido por animales a los que se les administró, en igual razón de volumen por peso corporal, la disolución salina (NaCl, 0,9 %).

Machos tratados

Concluido el tratamiento, cada macho tratado fue apareado durante dos semanas sucesivas con dos hembras no tratadas vírgenes por semana. Al concluir cada semana de apareo las hembras fueron reagrupadas en dos grupos, correspondientes a la primera y segunda semana de apareo y de acuerdo con el grupo de tratamiento.

Hembras tratadas

Una vez concluido el tratamiento, las hembras tratadas fueron apareadas durante una semana con machos no tratados (2:1). Después de

Tabla 1. Series y estudios experimentales realizados.

Serie experimental	Producto	Evaluación genotóxica
Control negativo (no tratado)	D-003	Micronúcleos
Control de vehículo (tratado con goma acacia-H ₂ O)	D-002	Micronúcleos
Ciclofosfamida	D-003	Micronúcleos
Control negativo (no tratado)	D-002	Letales dominantes
Control de vehículo (tratado con NaCl 0,9 %)	D-002	Letales dominantes
Ciclofosfamida	D-002	Letales dominantes

concluido este período, las hembras fueron agrupadas según el tratamiento recibido.

Con los animales del grupo control no tratado se procedió con el mismo sistema de apareamiento.

Tiempo de sacrificio

Todas las hembras fueron sacrificadas entre los días 12 y 18 de gestación, por tanto posterior al inicio de la funcionalidad de la placenta, cuando el *conceptus* está en un período de embriogénesis o fetogénesis (en roedores).

Metodología

En el análisis del contenido uterino se determinó: el número de hembras preñadas, implantes, fetos vivos, reabsorciones tempranas y tardías. También se extrajeron los ovarios, los cuales fueron colocados en una placa Petri con disolución salina fisiológica (NaCl 0,9 %) para realizar el conteo de los cuerpos lúteos con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Para determinar la letalidad inducida (LI) por la ciclofosfamida se empleó la fórmula:

LI - 1 -	Fetos vivos	
	Total de implantes (tratados)	100

Métodos estadísticos

En el ensayo de micronúcleos, se empleó la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, las variables analizadas fueron la citotoxicidad en la médula dada por el índice

de EP/EN y la frecuencia de aparición EP-MN

En el ensayo de letales dominantes la comparación estadística se realizó a través del estadígrafo no paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA) para cada una de las variables antes mencionadas.

Todas las comparaciones estadísticas, en ambos ensayos, se realizaron primero entre las distintas series no tratadas entre sí (Tablas 2, 3 y 4) y posteriormente, entre las no tratadas y las tratadas con ciclofosfamida (Tablas 5 y 6).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de los valores espontáneos de una línea para un determinado indicador fisiológico es común utilizar los datos de animales no tratados unidos a aquellos provenientes de animales tratados con los controles de vehículo de las sustancias investigadas. Entre los vehículos más frecuentemente utilizados se encuentran el agua, Tween, disolución salina, goma acacia, DMSO, aceite vegetal y otros.

En el análisis de la frecuencia inducida se empleó la ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal por vía ip. La ciclofosfamida es un agente alquilante de macromoléculas celulares metabolizado por el sistema P450 hepático,¹⁰ de lenta eliminación. Sus efectos citotóxicos están dados por la cantidad total administrada, más que por la velocidad de generación de sus metabolitos activos. Dentro de éstos,

están la mostaza fosfaramida y la acroleína ambos con potente acción clastogénica.⁴ Los metabolitos activos son tóxicos para el huso mitótico (venenos del huso), capaces de originar trastornos en la migración cromosómica y por lo tanto, pérdidas o rupturas cromosómicas. Estos constituyen eventos mutacionales que elevan la frecuencia de aparición de micronúcleos y mutaciones letales dominantes.^{11,12}

Ensayo de micronúcleos

Los resultados que se conocen del ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores, muestran un comportamiento muy estable en la frecuencia de aparición espontánea de EP-MN (0,8 a 3,4 por cada 1 000 EP) en la línea de ratones NMRI. Igualmente, estos resultados son muy similares a los reportados en otras líneas tales como: B6D2F1, C57B1/6 y CBA, ampliamente utilizadas en la genética toxicológica.¹³

Por otra parte, no se observan¹³⁻¹⁶ diferencias entre la frecuencia espontánea para ambos sexos en ninguno de los indicadores que el ensayo de micronúcleos en médula ósea tiene en cuenta, por lo que en muchos casos se unifican los resultados obtenidos para reportar los niveles espontáneos de la línea.

En cada serie se analizaron 12 000 EP para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las dos series experimentales, ni entre los sexos para

Tabla 2. Resultados correspondientes al ensayo de micronúcleos ratones NMRI en diferentes series experimentales.

Grupo	Dosis	Vía	Células		EP	EN	EP/EN	MN ^a	MN/EP ^b
			(mg/kg)	M					
Control negativo	-	-	12 000		6 336	5 664	1,12 (0,93-1,35)	26 (1-8)	2,16 (0,5-4,0)
Control negativo	-	-		12 000	6 426	5 574	1,15 (0,87-1,49)	28 (0-8)	2,33 (0-4,0)
Goma acacia - agua 10 mg/mL	10	oral	12 000		6 401	5 599	1,14 (0,89-1,51)	21 (1-6)	1,75 (0,5-3,0)
Goma acacia - agua 10 mg/mL	10	oral		12 000	6 471	5 529	1,17 (0,98-1,40)	25 (2-6)	2,08 (1,0-3,0)
Ciclofosfamida	50	ip	12 000		4 944	7 056	0,70** (0,43-0,89)	391 (45-86)	32,58** (22,5-43,0)
Ciclofosfamida	50	ip		12 000	5 025	6 975	0,72** (0,52-0,84)	445 (40-89)	37,08** (20,0-44,5)

(*) Valores mínimos y máximos reportados por animal

^a Número de EP con micronúcleos. ^{**} p < 0,01 Prueba de Kruskal-Wallis. ^b Valores determinados en 12 000 EP.

los dos tipos de grupo (Tabla 2). La frecuencia espontánea de la línea mostró un comportamiento estable, con una variación entre 1,75 y 3 EP-MN en las distintas series experimentales y una variación inter-individual de 0 a 4 EP-MN por cada 1 000 EP analizados, lo que coincide con lo reportado.¹³

Se pudo apreciar, además, una gran variabilidad inter-individual en la relación entre los eritrocitos polí y normo cromáticos. Sin embargo, la

media de cada serie no tratada con ciclofosfamida, se comportó de forma estable sin diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, en los animales tratados con ciclofosfamida se apreció que la respuesta al clastógeno (disminuye el índice EP/EN e incrementa la frecuencia de EP-MN) fue similar en ambos sexos de la línea utilizada, por lo que puede concluirse que no se evidenció diferente sensibilidad al mutágeno.

Se pudo comprobar (Tabla 5) el comportamiento espontáneo general de esta línea de ratones en el ensayo de micronúcleos. Los ratones de la línea NMRI suministrados por el CENPALAB manifestaron una frecuencia espontánea de EP portadores de micronúcleos de 2,29 por cada 1 000 EP, muy similar a la frecuencia de 2,06 reportada por Salamone.¹²

La dosis de ciclofosfamida empleada en los ensayos, para evaluar el daño genotóxico, no es letal y ha demostrado su poder clastogénico en diferentes estudios realizados.^{6,7,10,18,17} Este mutágeno indirecto induce un incremento, a este nivel de dosis, en la frecuencia de aparición de micronúcleos en unas 15 veces el número de EP-MN e inhibe la actividad eritropoyética en la médula ósea aproximadamente un 10 %. Ambos indicadores resultaron estadísticamente diferentes en relación con la frecuencia espontánea reportada en este trabajo (Tabla 5).

Ensayo de letales dominantes

Las mutaciones letales dominantes son cambios genéticos en el gameto, óvulo o esperma que provoca la muerte o fallo en la implantación del cigoto. La primera causa de estas mutaciones son las rupturas o

Tabla 3. Resultados correspondientes al ensayo de letales dominantes en ratones NMRI en diferentes series experimentales.

Grupo	Dosis	Vía	n	Hembra preñadas	Preñez (%)	
			M	H		
Control negativo	(1)	-	-	28	55	100
	(2)	-	-	25	50	92
	(3)	-	-	30	60	100
NaCl 0,9 %	(1) 1 mL/kg	ip	30T	60	56	93,3
	(2) 1 mL/kg	ip	28T	60	56	93,3
	(3) 1 mL/kg	ip	30	60T	57	95
Ciclofosfamida	(1) 50 mg/kg	ip	30T	60	56	93,3
	(2) 50 mg/kg	ip	30T	60	57	95
	(3) 50 mg/kg	ip	30	60T	56	93,3

T Sexo que recibió el tratamiento. ** p < 0,01 Prueba de Kruskal-Wallis.

(1), (2) Primera y segunda semana de apareo de los mismos ratones machos.

(3) Una única semana de apareo.

Tabla 4. Resultados correspondientes al ensayo de letales dominantes en ratones NMRI en diferentes series experimentales.

Grupo	Cuerpos lúteos	Implantes	FV	Letalidad	
				pre-implante	post-implante
Control negativo	(1) 12,09 ± 2,92	11,22 ± 2,97	10,60 ± 2,92	0,07 ± 0,12	0,06 ± 0,07
	(2) 12,10 ± 2,40	12,08 ± 2,10	12,01 ± 2,04	0,06 ± 0,10	0,05 ± 0,08
	(3) 12,29 ± 2,14	11,09 ± 2,52	10,47 ± 2,50	0,09 ± 0,13	0,05 ± 0,06
NaCl 0,9 %	(1) 13,17 ± 4,33	11,12 ± 4,46	10,52 ± 4,17	0,15 ± 0,20	0,06 ± 0,06
	(2) 12,39 ± 4,34	11,32 ± 3,82	10,73 ± 3,65	0,06 ± 0,17	0,05 ± 0,05
	(3) 11,43 ± 3,18	10,33 ± 3,05	9,86 ± 4,0	0,09 ± 0,09	0,04 ± 0,05
Ciclofosfamida	(1) 11,36 ± 3,56	7,75 ± 2,80**	4,21 ± 1,7**	0,29 ± 0,16**	0,42 ± 0,16**
	(2) 11,56 ± 3,71	8,28 ± 2,84**	4,96 ± 2,2**	0,26 ± 0,15**	0,53 ± 0,18**
	(3) 12,22 ± 4,17	8,33 ± 3,11**	4,72 ± 2,1**	0,29 ± 0,13**	0,40 ± 0,17**

* Sexo que recibió el tratamiento. ** p < 0,01 Prueba de Kruskal-Wallis. FV Fetos vivos.

(1), (2) Primera y segunda semana de apareo de los mismos ratones machos. (3) Una única semana de apareo.

Tabla 5. Frecuencia espontánea e inducida en el Ensayo de Micronúcleos con Ratones NMRI

Grupo	Dosis (mg/kg)	Vía	Célula sanalizadas	EP	EN	EP/EN	MN*	MN/EP ^b (10 ³)
Control	-	-	48 000	25 634	22 366	1,14 (0,87-1,51)	100 (0-8)	2,08 (0-4)
Ciclofosfamida	50	ip	24 000	9 969	14 031	0,71** (0,43-0,89)	836 (40-89)	34,83** (20,0-44,5)

(*) Valores mínimos y máximos reportados por animal. ** p < 0,01 Prueba de Kruskal-Wallis.

* Número de EP con micronúcleos. ^b Valores determinados en 48 000 EP.

Tabla 6. Frecuencia espontánea e inducida en el ensayo de Mutaciones Letales Dominantes con ratones NMRI

n		Grupo	
		No tratados	Ciclofosfamida
		M	H
	Hembras preñadas	171 330/345	60 ^a 169/180 ^c
	Preñez (%)	95,6	93,8
	Cuerpos Lúteos	12,24 (11,4-13,1)	11,71 (11,3-12,2)
	Implantes	11,31 (10,3-12,0)	8,12** (7,7-8,3)
	Fetos vivos	10,69 (9,8-12,0)	4,63* (4,2-4,9)
	Reabsorciones	Tempranas 0,36 (0,25-0,54)	2,73** (2,60-2,80)
		Tardías 0,22 (0,11-0,29)	0,70** (0,68-0,74)
		Totales 0,59 (0,45-0,65)	3,46** (3,30-3,60)
Letalidad	Pre-implante	0,07 (0,06-0,15)	0,28** (0,26-0,29)
	Post-implante	0,05 (0,04-0,06)	0,45** (0,40-0,53)

^a Número de machos tratados y apareados cada uno con cuatro hembras (dos por semana). ** p < 0,01 Prueba de Kruskal-Wallis. ^b N número de hembras tratadas.

^c Relación entre hembras apareadas y preñadas que incluye hembras de los machos tratados y hembras tratadas.

pérdidas cromosómicas las cuales pueden dar lugar, por ejemplo, a monosomias.^{5,10,18}

La línea de ratón utilizada influye en la respuesta observada en el ensayo de letales dominantes como resultado de la diferente capacidad de reparación del huevo fertilizado debido a la natural variabilidad biológica.^{5,18}

La línea NMRI ha sido utilizada en los estudios de teratogenicidad por su susceptibilidad a la acción de agentes como el TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) y TCAOB (3,4',4,4'-tetrachloroazobenceno) y sus principales manifestaciones han sido paladar hendido y a dosis elevadas embriletalidad.¹⁹

En los ensayos se pudo apreciar que se obtiene más de un 90 % de preñez, factor esencial para que una línea animal pueda ser utilizada en este tipo de estudio, debido a que las variables a analizar dependen, en primer término, del número de hembras preñadas (Tabla 3).

Por otra parte, los resultados fueron consistentes entre las diferentes series experimentales no tratadas con ciclofosfamida, no encontrando diferencias significativas en los indicadores analizados.

El número de cuerpos lúteos, implantes y fetos vivos por hembra preñada, se mantuvo en todas las series entre 10-13, lo que garantiza una muestra lo suficientemente grande para poder determinar estadísticamente la acción mutagénica que pudiera inducir el agente químico que se pretenda evaluar (Tabla 6).

Las muertes pre y post-implantación, discrepancias entre el número de cuerpos lúteos y el de implantes o fetos vivos, respectivamente, tienen en esta línea de ratones una frecuencia y variabilidad bajas (Tabla 6), sin diferencias estadísticas entre las series experimentales consideradas controles tanto si fueron las hembras o los machos los tratados.

De igual modo que en el ensayo de micronúcleos se manifestó

una respuesta positiva al tratamiento con la ciclofosfamida (Tablas 5 y 6).

Este mutágeno produce efectos similares, independientemente del sexo que haya recibido el tratamiento,²⁰ sin ocasionar una disminución de la fertilidad, pues el porcentaje de preñez y el número de cuerpos lúteos –indicador de la ovulación– no difirió entre los grupos tratados con ciclofosfamida y los grupos controles (Tabla 6).

El efecto de la ciclofosfamida se evidenció en la disminución del número de implantes y como resultado de un incremento del número de reabsorciones tempranas y tardías una disminución en el número de fetos vivos por hembra tratada.

Por otra parte, el daño inducido por la ciclofosfamida en los ratones machos no difirió al comparar las semana 1 y 2 de apareo y entre machos y hembras tratadas con este clastógeno; tampoco se observaron diferencias significativas en ninguno de los indicadores estudiados (Tabla 6). De ahí, se concluyó que la respuesta inducida por la ciclofosfamida en este ensayo se comporta de igual manera, independientemente del sexo que reciba el tratamiento y de la semana de apareo en el caso de los machos.

Se obtuvieron las frecuencias espontánea e inducida para este ensayo en la línea NMRI, para lo cual se unificaron todas las series experimentales no tratadas o tratadas con los vehículos de ambos sexos (Tabla 5) y los resultados de las series experimentales tratadas con ciclofosfamida.

La disminución de los implantes por hembra, dada como pérdida pre-implantación (muerte o huevos no fertilizados) y letalidad post-implantación (diferencias entre las implantaciones y los fetos vivos) en los animales tratados con ciclofosfamida fueron estadísticamente diferentes con relación a la frecuencia espontánea de esta línea de roedores.

Por tanto, la ciclofosfamida induce en los ratones NMRI, en las condiciones experimentales estudiadas, letalidad dominante de un 39,72 %, lo que evidencia el daño mutacional que origina la ciclofosfamida en las células germinales en este ensayo, lo que a su vez conduce a la pérdida de viabilidad del huevo fertilizado antes o después de la implantación sobre el valor del grupo control.

CONCLUSIONES

La línea de ratón NMRI suministrada por el CENPALAB constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, ya que experimenta una baja y estable frecuencia espontánea de importantes indicadores genotóxicos como la formación de eritrocitos policromáticos micronucleados, la relación EP/EN en médula ósea, las reabsorciones y las pérdidas pre y post implantación. Además, es sensible a la acción de mutágenos reconocidos como la ciclofosfamida.

BIBLIOGRAFIA

1. Hayashi M., Tice R.R., Mac Gregor J.T., Anderson D., Blakey D.H.; Kirsh-Volders M., Olesson Jr. F.B., Pachierotti F.R., Shimada H., Sutio S., Vannier B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut. Res.*, **312**, 293, 1994.
2. Anderson D. *Experimental Toxicology. The basic issues*, Chapter 13. *Genetic Toxicology*. Second Edition, USA, 243-286, 1993.
3. Bateman A. The Dominant Lethal Assay in the male mouse. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Second editions, edited by B.J. Kelberg. Elsevier Science Publishers, 1984.
4. Godman R. y Gilman H. Las bases farmacológicas de la terapéutica Capt 52, Octava edición. Editorial Médica Panamericana S.A., México, 1178-1181, 1991.
5. Ellling U.H., Machemer L., Bruselmaier W., Dycka J., Frohberg H., Kratochivilova J., Lang R., Korka D., Müller D., Ph. J., Roll R., Schulze-Schencking M. and Weitman H. Standard protocol for the dominant lethal test on male mice, *Archiv. Toxicol.*, **39**, 173, 1974.
6. Rodeiro I., Gámez R., Acosta P.C., Alemán C. y Fernández S.I. Estudio de inducción de letales dominantes del D-002 en ratones NMRI de ambos sexos. *Revista Cubana Inv. Biomédicas*, **18**, 43, 1999.
7. Rodeiro I., Gámez R., Acosta P.C., Fernández S.I., Más R. y Alemán C. Estudio de la genotoxicidad del D-002, un producto con actividad antiulcerosa. *Revista Española de Toxicología*, **15**, 117, 1998.
8. Carabajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R. and Magraner J. Possible mechanism cytoprotective of D-002 an antiulcerogenic product isolated from beexwas. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 858, 1996.
9. Rodríguez M., Gámez R., Sánchez M., and García H. Developmental Toxicity of D-002 (a mixture of aliphatic primary alcohols) in Rats and Rabbits. *J. Appl. Toxicol.*, **18**, 313, 1998.
10. Manson J.M. and Smith C.C. Influence of cyclophosphamide and 4-ketocyclophosphamide on mouse limb development. *Teratol.*, **15**, 291, 1997.
11. Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparay Ph. and Mac Gregor J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present and Future. *Environ. Mol. Mutagen.*, **18**, 277, 1991.
12. Kirk K.M. and Lyon M.F. Induction of congenital malformations in the offspring of males mice treated with x rays at pre-meiotic and post meiotic stages. *Mut. Res.*, **14**, 173, 1984.
13. Salamone M.F. and Mavournin K.H. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**, 239, 1994.
14. The collaborative study group for the micronucleus test. Sex difference in the micronucleus test. *Mut. Res.*, **172**, 151, 1986.
15. Holmstrom M. Sex differences in the micronucleus test: True or False? *Mut. Res.*, **3**, 177, 1988.
16. The collaborative Study Group for the Micronucleus Test: Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of 5th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. *Mut. Res.*, **278**, 83, 1991.
17. Aujoulat M., Forichon A. and Descotes J. Is a positive control useful in the rat *in vivo* micronucleus test? A comparative study of different routes of administration of cyclophosphamide. ICT VIII, Paris, France, July, 1998.
18. Lovell D.P., Anderson D. and Jenkins PC. The use of battery of strains of mice in factorial design to study the induction of dominant lethal mutations. *Mut. Res.*, **187**, 37, 1987.
19. D'argy R., Hassoun E. and Dencker L. Teratogenicity of TCDD and the congener 3,3',4,4' tetrachloroazoxybenzene in sensitive and non-sensitive mouse strains after reciprocal blastost. *Toxicol. Lett.*, **21**, 197, 1984.
20. Bishop J.B., Kodell R.L., Whrorton E.B. and Domon O.E. Dominant lethal test response with IMS and TEM using different combinations of male and female stocks of mice. *Mut. Res.*, **121**, 273, 1983.

IV TALLER INTERNACIONAL

LOS ARBOLES Y LA SOSTENIBILIDAD DE LA PRODUCCION GANADERA

Del 29 de noviembre al 2 de diciembre del 2000.

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES "INDIO HATUEY"

Central "España Republicana", Perico, Matanzas, Cuba.

Temáticas: Identificación y caracterización de leñosas. Sistemas de corte y acarreo.

Silvopastoreo, interrelación silvopastoreo-ambiente. Sostenibilidad.

Transferencia de tecnología. Socioeconomía y ecología de los sistemas silvopastoriles

Cuota de inscripción: 100,00 USD.

Se abonará en el momento de la acreditación en la propia sede el Taller.

Comité Organizador: Ing. Girardo Martín Martín

Fax: (53)(52) 53112

e-mail: dbeepfh@uclv.etcasa.cu