

# Evaluación mutagénica del D-002 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratas Sprague Dawley de ambos sexos

Rafael Gámez Menéndez, Ivonne S. Fernández Rodríguez, Pilar C. Acosta, Celia Alemán Santiago e Idania Rodeiro Guerra.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 6 de septiembre de 1997. Aceptado: 9 de enero de 1998.

Palabras clave: ensayo de micronúcleos, médula ósea, genotoxicidad, ratas Sprague Dawley, D-002  
Key words: micronucleus assay, bone marrow, genotoxicity, Sprague Dawley rats, D-002.

**RESUMEN.** El D-002 es una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular aislada y purificada a partir de la cera de abejas (*Apis mellifera*), la cual presenta moderada acción antiinflamatoria y actividad antiulcerosa efectiva en diferentes modelos animales. Se realizó el estudio de micronúcleos en médula ósea de ratas Sprague Dawley de ambos sexos a las cuales se les administró D-002 por vía oral durante 90 d en dosis de 25, 125 y 625 mg/kg. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles, en la frecuencia de eritrocitos policromatófilos micronucleados y el índice de eritrocitos policromatófilos/eritrocitos normocromatófilos en ninguna de las dosis y sexos. Estos resultados indican la inocuidad genotóxica del D-002 en este sistema de ensayo, los cuales concuerdan con otros estudios de genotoxicidad ya realizados.

**ABSTRACT.** D-002 is a natural mixture of higher aliphatic primary alcohols isolated and purified from beeswax (*Apis mellifera*). D-002 shows moderate anti-inflammatory action and effective antiulcer activity in different experimental models. Bone marrow micronucleus assay was done in Sprague Dawley rats from both sexes administered orally with D-002 (25, 125 and 625 mg/kg) for 90 d. No significant differences were found between control and treated groups of both sexes in the polychromatic/normochromic ratio (PCE/NCE). This result shows an absence of cytotoxicity of D-002 on bone marrow cells. Likewise, the frequency of micronucleated erythrocytes was statistically similar in non-treated and treated animals of both sexes. These last results agree with previous genotoxicity tests, using *in vitro* and *in vivo* assays, indicating a non-genotoxic effect of D-002.

## INTRODUCCION

El D-002 es una mezcla definida de alcoholes alifáticos primarios superiores aislada de la cera de abejas *Apis mellifera*, que presenta moderada acción antiinflamatoria y actividad antiulcerosa efectiva en diferentes modelos experimentales.<sup>1,2</sup>

Teniendo en cuenta su promisoría acción antiulcerosa, se llevaron a cabo diferentes estudios toxicológicos utilizando la vía oral de administración tales como: toxicología aguda y subaguda en ratas y ratones con

dosis de hasta 5 g/kg, subcrónica en ratas y ratones utilizando entre 5 y 625 mg/kg, así como un estudio crónico en ratas con dosis de 250, 500 y 1 000 mg/kg. En ninguno de estos ensayos se observaron signos de toxicidad atribuibles al tratamiento. Por otra parte, en los estudios de genotoxicidad realizados, el ensayo con *Salmonella typhimurium* (5, 500, 2 000 y 5 000 mg/placa) y el estudio de la morfología de la cabeza del espermatozoide (25, 125 y 625 mg/kg), no se evidenciaron efectos genéticos

sobre procariontes, ni sobre células germinales de ratón, respectivamente.

La prueba de micronúcleos en médula ósea,<sup>3,4</sup> es quizás el ensayo de genotoxicidad *in vivo* más comúnmente empleado, por ser un sistema rápido y reproducible para determinar daño cromosómico, a la vez que brinda clara información acerca del efecto de los compuestos químicos sobre la proliferación celular en médula ósea.<sup>5</sup> Este ensayo permite detectar la capacidad de determinados compuestos químicos de inducir *in vivo* rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis, produciendo de esta manera micronúcleos. Asimismo, permite extrapolar los resultados a aquellos que se obtendrían en ensayos de células germinales empleando las mismas dosificaciones.<sup>6</sup>

El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible actividad genotóxica del D-002, tras su administración por vía intragástrica a ratas de ambos sexos durante tres meses.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley (seis animales por grupo y por sexo) hembras y machos adultos jóvenes provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana, cuyos pesos oscilaban entre 150 y 200 g, los cuales se adapta-

ron durante 14 d a las condiciones de laboratorio [(25 ± 2)°C, humedad relativa (60 ± 5) % y ciclos de luz-oscuridad de 12 h] y se colocaron en jaulas a razón de cuatro animales por jaula. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*.

### Administración y dosificación

Los animales utilizados en el presente trabajo forman parte de un estudio toxicológico subcrónico, en el que fueron tratados mediante entubación gástrica durante 90 d. Este esquema fue seleccionado bajo el criterio de la integración de los estudios de toxicología general con los de genética toxicológica, teniendo en cuenta que esquemas de dosis repetidas, en este ensayo, mantienen igual sensibilidad que protocolos de dosis únicas<sup>7</sup> y que los resultados son perfectamente comparables.<sup>7,8</sup>

El producto de ensayo (lote 021093), se administró en forma de suspensión en vehículo de goma acacia-agua (10 mg/mL). La cantidad de él utilizada en la preparación de las suspensiones fue calculada a partir de los pesos de los animales y ajustada semanalmente para cada grupo.

Las dosis fueron las utilizadas en los estudios de toxicología subcrónica (25, 125 y 625 mg/kg), a fin de observar la posible acción acumulativa del producto tras su administración prolongada.

### Sacrificio

Los animales fueron sacrificados aleatoriamente 24 h después de ad-

ministrar la última dosis, por dislocación cervical. Posteriormente, a cada animal se le extrajo uno de sus fémures y se lavó por succión con suero de ternero fetal la cavidad medular para obtener la médula ósea.

### Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos se realizó de acuerdo con lo establecido por Hayashi,<sup>4</sup> Las muestras fueron centrifugadas a 1 000 r/min durante 5 min. Luego de eliminar el sobrenadante, se montó un frotis del botón celular (dos láminas por animal). Para determinar genotoxicidad, se calculó la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EP) portadores de micronúcleos en 1 000 EP por animal. Además, se registró el índice de EP/eritrocitos normocromáticos (EN) en 1 000 eritrocitos por animal como indicadores de la proliferación celular.<sup>4,9</sup>

El conteo celular se realizó en láminas codificadas por duplicado por dos observadores.

### Análisis estadístico

La citotoxicidad se evaluó por el ensayo no paramétrico de Kruskal Wallis para el índice EP/EN, mientras que la frecuencia de EP micronucleados, se evaluó mediante la prueba de Kruskal Wallis, luego de comprobar una distribución de Poisson para los EP portadores de micronúcleos.<sup>10</sup>

### RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las determinaciones (índice EP/EN y frecuencia de EP con mi-

cronúcleos) se realizaron sobre la base de 1 000 eritrocitos contados por animal, lo que se corresponde con los indicadores establecidos.<sup>8,11</sup>

El análisis estadístico de los valores relativos a cada indicador no evidenció efecto genotóxico del D-002, al no aumentar la frecuencia de aparición de micronúcleos en los grupos tratados de ambos sexos a las diferentes dosis con relación a los controles. Esto hace suponer que el D-002 no interfiere el funcionamiento del aparato del huso mitótico, ya que de ser así, se producirían anomalías en la migración de los cromosomas metafásicos, evento este, que ocasionaría la formación de micronúcleos con cromosomas completos. Tampoco provoca deleciones cromosómicas, daño que constituye una fuente importante de formación de eritrocitos micronucleados. Por otra parte, la frecuencia de aparición de EP con micronúcleos tanto en los grupos tratados como en los controles de ambos sexos (Tabla 1), se mantuvo dentro del intervalo de frecuencias espontáneas reportadas para ratas de esta línea.

La comparación entre los sexos no reveló la existencia de diferencias en ninguno de los indicadores estudiados, lo que hace suponer un metabolismo no diferencial del D-002.<sup>4,11</sup>

Los resultados genotóxicos negativos obtenidos en este ensayo en el que se evalúa daño cromosómico, unido a los de evaluación de mutaciones génicas *in vitro* e *in vivo* como son el ensayo con *Salmonella*

**Tabla 1.** Resultados correspondientes al ensayo de micronúcleos en ratas Sprague Dawley de ambos sexos tratadas con D-002 y vehículo.

Dosis (mg/kg)	n	Sexo	EP	EN	MN	EP/EN	MN/EP (· 10 <sup>-3</sup> )
Control	6	H	2 824	3 176	10 (1-3)	0,89 (0,82-1,06)	1,66
25	6	H	2 773	3 227	8 (0-3)	0,86 (0,74-1,05)	1,33
125	6	H	2 898	3 102	13 (1-3)	0,93 (0,68-1,28)	2,16
625	6	H	2 920	3 080	11 (1-3)	0,95 (0,73-1,27)	1,83
Control	6	M	2 992	3 008	9 (0-2)	0,99 (0,91-1,27)	1,50
025	6	M	2 981	3 019	9 (0-3)	0,98 (0,64-1,16)	1,50
125	6	M	2 897	3 103	10 (1-3)	0,93 (0,76-1,04)	1,66
625	6	M	2 860	3 140	7 (0-2)	0,91 (0,72-1,04)	1,17

Determinaciones en 1 000 células por animal. EP, EN Eritrocitos policromáticos y normocromáticos.

MN Eritrocitos con micronúcleos. MN/EP Frecuencia de MN en la población de EP.

( ) Valores menores y mayores reportados dentro del grupo.

*typhimurium* y el de la morfología de la cabeza del espermatozoide permiten considerar al D-002 como un posible compuesto no genotóxico, ya que cada uno representa los diferentes niveles en la estrategia a seguir para la detección de mutágenos (*in vitro* - Ames -, *in vivo* - micronúcleos -, ensayos sobre el efecto en las células germinales *in vivo* - morfología del espermatozoide -)<sup>12</sup>.

El índice EP/EN y el porcentaje de EP son indicadores de citotoxicidad en médula ósea, siendo la relación normal entre EP y EN prácticamente 1:1. Un desbalance de esta relación, fundamentalmente, una disminución drástica de los EP post-tratamiento, constituye un indicador de daño en la proliferación celular en médula, lo que evidencia la toxicidad de una sustancia en ensayo. De tener efecto citotóxico el D-002, el esquema de tratamiento seguido en este estudio pudiera provocar, una marcada eritrocitopenia, toda vez que la acción citotóxica se mantendría durante tres meses. En ninguna de las dosis se apreció efecto citotóxico del D-002, ya que no se observó desbalance en la proliferación celular en médula ósea, expresada a través de los valores estables de estos indicadores en todos los grupos experimentales de ambos sexos.

## CONCLUSIONES

Se comprobó la no actividad citotóxica, ni clastogénica del D-002 *in vivo*, lo que sumado a los resultados negativos obtenidos previamente en el ensayo de Ames y en el de la morfología de la cabeza del espermatozoide, apunta hacia la inocuidad del D-002 como agente genotóxico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L. and Más R. Effect of D-002: an active product isolated from beeswax on experimental induced ulcers, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **47**, 731, 1995.
2. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Rodeiro I., Más R. and Magraner J. Possible mechanism cytoprotective of D-002. An antiulcerogenic product isolated from beeswax, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **48**, 858, 1996
3. Schmid W. The micronucleus assay. **Mutation Research**, **31**, 9, 1975.
4. Hayashi M., Tice R.R., Mac Gregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Kirsh-Volders M., Olesson Jr F.B., Pachierotiti F.R., Shimada H., Sutuo S., Vannier B.: *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, **312**, 293, 1994
5. Salamone M.F. *et al.* Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus

frecuencias. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **23**, 239, 1994.

6. Waters M.D. The performance of short-term test in identifying potential germ cell mutagens: a qualitative and quantitative analysis. **Mutation Research**, **341**, 221, 1994.
7. Mac Gregor J.T., Tucker J.D., Eastmond D.A. and Wyrubek A.J. Integration of Cytogenetic Assays With Toxicology Studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **25**, 328, 1995.
8. Heddle J.A. Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F, Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparayu Ph. and Mac Gregor J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage. **Past, Present and Future. Environmental and Molecular Mutagenesis**, **18**, 277, 1991.
9. Henderson-L. Fedyk-J.; Windebank-S; Smith-M. Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine. **Mutation Research**, **291**, 79, 1993.
10. Mithell I. and Brice A.J. Investigations into parametric analysis of data from *in vivo* micronucleus assays by comparison with non-parametric methods. **Mutation Research**, **159**, 139, 1986.
11. Holmstrom M. Sex differences in the micronucleus test: True or False?. **Mutation Research**, **3**, 177, 1988.
12. Anderson D. Experimental Toxicology. The basic issues, Chapter 13. Genetic Toxicology. Second Edition, USA, 243-286, 1993.