# Evaluación genotóxica del OLEOZON mediante los ensayos de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica de ratón

**Antonia C. Remigio Montero, Yousy González Carvajal,* Zullyt Zamora Rodríguez,* Gladys Fonseca López** y Jesús Molerio Mirabal.***

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, Finca "Tirabeque", Carretera del Cacahual km 2 ½, Bejucal, La Habana. *Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, **Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 1997. Aceptado: 20 de diciembre de 1997.

Palabras clave: genotoxicidad, ensayo de micronúcleos, médula ósea.
Key words: genotoxicity, micronucleus assay, bone marrow.

**RESUMEN.** Se estudió la actividad genotóxica del OLEOZON, mediante los ensayos de micronúcleos en médula ósea y en sangre periférica en ratones de la línea Cenp:NMRI de ambos sexos. Este ensayo constituye una determinación indirecta de la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas. La evaluación genotóxica del OLEOZON se llevó a cabo a través del análisis y la comparación de las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos policromáticos en la médula ósea, obtenidos para el tratamiento con aceite de girasol ozonizado con índice de peróxido entre 617 y 680 y los controles: aceite de girasol y ciclofosfamida con 40 mg/kg de peso corporal, sustancia con propiedades clastogénicas que provoca un incremento en las roturas cromosómicas. Se realizaron cinco administraciones consecutivas por vía intragástrica con intervalos de 24 h de una dosis correspondiente a la límite (2 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) basada en la no evidencia de toxicidad en los estudios subcrónicos por vía oral del producto. No se evidenciaron efectos tóxicos en la población eritrocítica estudiada y se obtuvieron resultados negativos en la inducción de clastogenicidad (inducción de aberraciones cromosómicas) al determinar la cantidad de micronúcleos presentes en eritrocitos policromáticos para el índice de peróxido estudiado.

**ABSTRACT.** It was accomplished the study of the OLEOZON genotoxic activity through the micronucleus assay in bone marrow, using Cenp: NMRI mice of both genders. This assay provides an indirect measure of the induction of structural or numerical chromosome aberrations. The evaluation was carried out through analysis and comparison of frequencies micronuclei in polychromatic erythrocytes in bone marrow of an experimental group of 10 mice treated with ozonized sunflower oil and a negative and positive control groups of 10 mice treated with sunflower oil and cyclophosphamide (40 mg/kg of corporal weight), respectively. They were accomplished five consecutive administrations by oral gavage, with intervals of 24 h of a limit dose (2 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) based on no evidence of toxicity in subchronical studies by oral gavage with this product. There was no evidence of toxic effects in the erytrocytic population studied and negative results were obtained in the citotoxicity and clastogenicity inducement (chromosome aberrations inducement).

## INTRODUCCION

La mutagénesis se refiere a las modificaciones del material genético, espontáneas o inducidas química o físicamente que afectan al individuo o a las células y que provocan una variación permanente y hereditaria de las generaciones siguientes de individuos o de células respecto a las precedentes.[1] Entre los ensayos genéticos con mamíferos el ensayo de micronúcleos en ratón ha sido ampliamente utilizado como un indicador de la genotoxicidad de clastógenos químicos *in vivo*,[2,3] ya que resulta relativamente simple en comparación con el análisis cromosómico convencional.[4] Teniendo en cuenta las propiedades terapéuticas del aceite ozonizado en diversas patologías digestivas tales como la giardiasis[5] y la úlcera gastrointestinal,[6] este trabajo se propuso evaluar su posible efecto citotóxico y clastogénico (inductor de aberraciones cromosómicas) mediante los ensayos de micronúcleos en médula ósea[7] y en sangre periférica.[8]

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones de la línea Cenp: NMRI de ambos sexos, los cuales tenían entre 7 y 8 semanas de edad y 30 g de peso corporal. Estos animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura de 22 a 24 °C, humedad de 50 a 60 % y cambios de luz-oscuridad de 12x12, con una die-

ta comercial EMO 1001 para roedores y agua *ad libitum*. Se conformaron tres grupos de tratamiento para cada ensayo: ciclofosfamida (40 mg/kg p.c.), aceite de girasol (0,1 mL) y aceite de girasol ozonizado (índice de peróxido de 617: 0,1 mL) la cual representa una dosis de 2 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ que se corresponde con la dosis límite, para períodos de tratamiento menores de 14 d y está basada en la no evidencia de toxicidad en los estudios subcrónicos por vía intragástrica del producto. [9] Cada grupo estaba compuesto por 10 animales (cinco hembras y cinco machos). Se realizaron cinco administraciones consecutivas con intervalos de 24 h por vía intragástrica. El grupo Control positivo recibió una sola administración por vía intraperitoneal [9] de ciclofosfamida (citostático con propiedades clastogénicas que provoca un incremento de las roturas cromosómicas). Los animales son sacrificados por dislocación atlanto axoidea a las 24 h después de la última administración; este tiempo de muestreo está basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones.[9] El proceso para obtener las muestras de médula ósea fue realizado de acuerdo con la metodología propuesta por Schmid en 1975.[7] Se extrajeron ambos fémures y se colectó la médula ósea con suero fetal bovino, se centrifugó esta fase líquida a 1 000 r/min durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 $\mu$L de suero fetal. Se realizaron dos frotis por animal, se secaron al aire y se fijaron con metanol absoluto durante 5 min. A las 24 h postfijación se tiñeron con Giemsa filtrada al 5 % durante 15 min.[10] Se analizaron 500 eritrocitos policromáticos por lámina (1 000 por animal) para determinar el índice de citotoxicidad (PCE/NCE) y el porcentaje de micronúcleos (MN/PCE).

En el caso del ensayo en sangre periférica la metodología seguida fue la propuesta por Hayashi en 1990.[8]

Se realizaron dos muestreos a las 48 y 72 h.

Aproximadamente 5 $\mu$L de sangre se colecta de la cola del animal y se coloca en el centro de láminas precalentadas y teñidas con 5 $\mu$L de naranja de acridina (1 mg/mL) y se presiona la gota de sangre con un cubreobjetos [(24X40) mm]. Se realizan dos láminas por animal y se analizan 500 reticulocitos por lámina (1 000 por animal) para determinar la frecuencia de micronúcleos.

Todas las mediciones se realizan en un microscopio de fluorescencia con excitación azul (488 nm) y filtro amarillo (515 nm) con objetivo de 100x.

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para el procesamiento estadístico de todos los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las comparaciones entre la relación de eritrocitos policromáticos (PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE) en las preparaciones de médula ósea a través de la prueba estadística Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) no arrojó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento de aceite ozonizado y aceite de girasol, resultados que indican que no existen perturbaciones en la hematopoiesis como resultado de estos tratamientos para ambos sexos, pues como se observa el aceite ozonizado incrementa ligeramente el índice de citotoxicidad (Tabla 1); si se tiene en cuenta que un índice de toxicidad con un valor mayor evidencia una menor depresión medular (PCE/NCE). Resultados similares fueron obtenidos por Fernández y col. en 1989,[11] al evaluar la acción del aceite ozonizado por vía intragástrica sobre la multiplicación celular de la médula ósea de animales tratados con él.

De manera general, el Control positivo utilizado no indujo efectos citotóxicos sobre la médula ósea de ratón, puesto que se utilizó una dosis de ciclofosfamida que sólo incrementa el índice de genotoxicidad en la proporción de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos, pero no deprime la médula ósea,[14] por lo que las diferencias significativas obtenidas para este índice en las hembras se pueden considerar discretas, si se tiene en cuenta que el índice de toxicidad reportado para las líneas cubanas se encuentra entre 1,1-1,6[13] e internacionalmente para la especie[11] hasta 1,7.

Tampoco las frecuencias de micronúcleos en PCE en los grupos tratados con aceite de girasol y aceite ozonizado mostraron diferencias estadísticamente significativas (para machos fue de 0,08 y 0,12 y para hembras de 0,19 y 0,17), resultados que evidencian que el aceite ozonizado no tiene efectos genotóxicos sobre la médula ósea de los ratones tratados.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Fernández y col. en 1989,[11] al no encontrar daños de tipo citogenético sobre la médula ósea de ratones tratados con dosis de aceite ozonizado hasta 15 veces superiores a la máxima terapéutica empleada.

Se observó para los tres grupos de tratamiento, que el tiempo óptimo para la inducción de micronúcleos en eritrocitos jóvenes (reticulocitos) (48 h) se corresponde con el determinado por Hayashi y col. en 1990 (Tabla 2).[8]

Las frecuencias de reticulocitos con micronúcleos en los grupos tratados con aceite ozonizado y no ozonizado no mostaron diferencias significativas en los dos muestreos estudiados y para ambos sexos, resultado que constituye una respuesta negativa en la inducción de aberraciones cromosómicas de estos tratamientos.[12]

Estos resultados difieren de los obtenidos en el grupo que recibió ciclofosfamida, agente clastogénico que incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos, en ambos sexos y para los dos muestreos estudiados.

**Tabla 1.** Indices de toxicidad y de genotoxicidad en eritrocitos policromáticos en médula ósea para los tres grupos de tratamiento y en ambos sexos.

| Tratamiento | Sexo | n | Total de PCE observadas | Indice de toxicidad (PCE/NCE) | Indice de genotoxicidad (MN/PCE) |
|---|---|---|---|---|---|
| Aceite de girasol | M | 5 | 5 000 | 1,91 ± 0,28 | 0,08 ± 0,13 |
| | F | 5 | 5 003 | 2,54 ± 0,63 | 0,19 ± 0,25 |
| Aceite ozonizado | M | 5 | 5 000 | 2,12 ± 0,56 | 0,12 ± 0,16 |
| | F | 5 | 5 025 | 2,99 ± 0,91 | 0,17 ± 0,11 |
| Ciclofosfamida | M | 5 | 5 000 | 1,90 ± 0,24 | 0,64 ± 0,21*** |
| | F | 5 | 5 000 | 1,35 ± 0,25*** | 0,72 ± 0,19*** |

PCE y NCE Eritrocitos policromáticos y normocromáticos.
*** Significación para $p < 0,05$.

**Tabla 2.** Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos en sangre periférica para los tres grupos de tratamiento y en ambos sexos.

| Tratamiento | | Aceite de girasol no ozonizado (0,1 mL) | | Aceite de girasol ozonizado (0,1 mL) | | Ciclofosfamida (40 mg/kg) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Muestreo (h) | Sexo | Total de RET | MN/RET (%) | Total de RET | MN/RET (%) | Total de RET | MN/RET (%) |
| 48 | M | 5 000 | 0,36 ± 0,32 | 5 000 | 0,44 ± 0,28 | 5 000 | 1,26 ± 0,71* |
| | F | 5 000 | 0,16 ± 0,18 | 5 000 | 0,18 ± 0,20 | 5 000 | 1,62 ± 0,43* |
| 72 | M | 5 000 | 0,2 ± 0,15 | 5 000 | 0,1 ± 0,14 | 5 000 | 0,82 ± 0,13* |
| | F | 5 000 | 0,08 ± 0,08 | 5 000 | 0,04 ± 0,04 | 5 000 | 0,8 ± 0,33* |

RET Reticulocitos. MN Micronúcleos.
* Significativo para $p < 0,05$.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con ozono no provoca daño citotóxico en la línea eritrocítica estudiada como lo corrobora el análisis de la relación de eritrocitos normocromáticos/policromáticos, ni se evidencian efectos clastogénicos en la médula ósea de los animales tratados bajo las condiciones experimentales de este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA


1. Organization for Economic Co-Operation and Development Guidelines for the testing of chemicals. 1-2, 1993.
2. Mac Gregor J.T., Wehr C.M. and Gould D.H. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environ. Mutagen, 2**, 509, 1980.
3. Moore F.R., Urda G.A., Krishma G. and Theiss J.C. An *in vivo/in vitro* method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen. 1.-Studies with cyclophosphamide. **Mutation Research 335**, 191, 1995.
4. Bhaskar B.G. and Mac Fadden L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research, 347**, 97, 1995.
5. Sardiñas J.O., Behar R., García C.E. and Gómez M. Tratamiento de la giardiasis recidivante con ozono. **Revista CENIC Ciencias Biológicas, 20**, 1989.
6. Behar R., García C.E., Sardiñas J. Menéndez S., Gómez M., Lemagne C y Alvarez C. Tratamiento de la úlcera gastroduodenal con ozono. **Revista CENIC Ciencias Biológicas, 20**, 1989.
7. Schmid W. The micronucleus test. **Mutation Research, 31**, 9, 1975.
8. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T and Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research, 245**,245,1990.
9. Hayashi M., Tice R., Mac Gregor J., Anderson D., Blacky D., Kirsh-Volders M., Oleson F., Pacchierotti FF, Romagna. F., Shimada H., Sutou S. and Vannier B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research, 312**, 293, 1994.
10. Gollapudi B.B and Kamra O.P. Application of a simple Giemsa staining method in the micronucleus test. **Mutation Research, 64**, 45, 1978.
11. Fernández S.I. Quinzan C., Menéndez S. y Gómez M. Evaluación mutagénica del aceite ozonizado administrado intragástricamente. **Revista CENIC Ciencias Biológicas, 20**, 1989.
12. Mavournin K., Blakey D., Cimino M., Salomé M. and Heddle L. The *in vivo* micronucleus assays in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the USA environmental protection Agency GeneTox Program. **Mutation Research, 239**, 29, 1990.
13. Cancino L., Fonseca G., Remigio A., Salomé I., Alvarez X. y Palacios M. Inducción de micronúcleos por ciclofosfamida en médula ósea de ratón en cinco líneas diferentes. Programa del V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, abril, 42, 1993.
14. Gollapudi B. and McFadden L. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research, 347**, 97, 1995.