

EFECTOS DEL MAZINEB SOBRE EL DESARROLLO DE EMBRIONES DE RATA IN VITRO

M.D. Rodríguez, H. García y M. Friman

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 1ro. de noviembre de 1987

ABSTRACT. Rat embryos (10 day old) were exposed in vitro to Mazineb (a zinc furfuryl dithiocarbamate proposed to use as a pesticide) at concentrations from 0,1 to 100 µg/mL. After 24 h exposure, the embryos showed a concentration-dependent decrease in growth and development parameters (crown-rump length and number of somites) and did not show embryonic malformations in any of the concentration assayed. These results are in agreement with the findings in pregnant rats and confirm that the Whole Embryo System Culture adequately reproduces in vivo results.

RESUMEN. Embriones de 10 d fueron explantados y expuestos a concentraciones desde 0,1 hasta 100 µg/mL de Mazineb, un furfuril ditiocarbamato de zinc propuesto como pesticida. Después de una exposición de 24 h los embriones mostraron un decremento en los parámetros de crecimiento y desarrollo (longitud cráneo-caudal y número de somitas dependiente de la concentración). No se observaron efectos teratogénicos con ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en ratas preñadas y reafirman el criterio de que el Sistema de Cultivo de Embriones es capaz de reproducir adecuadamente los resultados in vivo.

INTRODUCCION

Las características toxicológicas de los pesticidas organofosforados han originado restricciones en su uso por lo que se ha impuesto la necesidad de desarrollar otros tipos de compuestos con propiedades insecticidas, fungicidas, herbicidas, etcétera.¹

En 1975, Macías y col.² sintetizaron el Mazineb, un furfuril ditiocarbamato de zinc que demostró propiedades fungicidas en la prueba de campo y bajos niveles de toxicidad en estudios agudos en animales.³

La investigación de las propiedades toxicológicas del Mazineb ha continuado profundizándose. En 1985, Friman y col.⁴ estudiaron el potencial teratogénico de este preparado en ratas preñadas, y encontraron que la dosis de 300 mg/kg de peso es tóxica para las madres y produce disminución de la talla y el peso de los fetos, sin evidenciar malformaciones.

Un análogo comercial, el Zineb, tiene efectos teratogénicos al administrarlo en dosis tóxicas a la rata.⁵

En esta investigación se empleó el Sistema de Cultivo de Embriones⁶ que permite conocer el efecto directo del Mazineb en concentraciones precisas, sin interferencias con el organismo materno. El estudio se lleva a cabo en estadios críticos de la organogénesis, cuando la sensibilidad a agentes teratogénicos es muy alta.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratas Wistar del bioterio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, de 3 meses y con un peso entre 200 y 250 g, las cuales tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

Se aparearon dos hembras nulíparas con cada macho durante toda la noche. A la mañana siguiente se verificó la cópula por la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal. Este día se consideró como día cero de la gestación.

Condiciones de cultivo. Los embriones fueron explantados a los 10 d de la preñez, según la técnica de New. La remoción del útero, decidua, saco vitelino parietal y membrana de Reichert se llevó a cabo dejando intactos el saco vitelino visceral, el cono ectoplacentario y el amnios.

Como medio de cultivo se utilizó suero de rata obtenido de sangre inmediatamente centrifugada a 3 000 r/min durante 5 min e inactivado por calor a 56 °C durante 30 min.

Se depositaron de 3 a 5 embriones en cada frasco con 5 mL de suero.

La fase gaseosa para las primeras 20 h de cultivo fue: O₂:CO₂:N₂ (20:5:75). Las últimas 4 h se cambió a O₂:CO₂:N₂ (40:5:55) por el aumento de la necesidad de O₂ en los embriones.

Los frascos se mantuvieron a 37 °C en rotación continuamente a 30 r/min durante 24 h.

Mazineb. El producto fue sintetizado por Macías y col. en el laboratorio de Síntesis del CENIC. La pureza determinada por RMN ¹³C fue mayor del 99 %.

El compuesto fue administrado al comienzo del cultivo en concentraciones desde 0,1 hasta 100 µg/mL. Debido a su insolubilidad en agua se suspendió en gelatina al 2 %.

Parámetros medidos. Después de 24 h de cultivo, se revisaron los embriones en un estereomicroscopio. Se registraron la viabilidad y los índices de crecimiento y desarrollo (longitud cráneo-caudal número de somitas) y malformaciones morfológicas.

Se consideraron viables a aquellos embriones que tenían circulación activa en el saco vitelino y latidos del corazón; sólo en éstos se registraron los parámetros de desarrollo.

Estadística. Para evaluar la significación de las diferencias entre los grupos experimentales, se usó el test t de Student.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla I muestra la respuesta de los embriones de ratas expuestos *in vitro* al Mazineb.

TABLA I

Efectos del Mazineb sobre embriones de rata en cultivo

Tratamiento (g/mL)	Embriones explantados	Viabilidad cráneo-caudal (%)	Longitud (mm)	Sómitas
control	32	100	3,7 ± 0,21	25,1 ± 1,05
100	5	0	-	-
50	13	0	-	-
30	19	42	2,3 ± 0,17*	13,2 ± 4,80*
20	15	100	3,4 ± 0,29	24,1 ± 0,94
15	15	100	3,6 ± 0,26	24,8 ± 1,22
10	12	100	3,6 ± 0,37	25,5 ± 0,96
5	10	100	3,8 ± 0,17	25,6 ± 0,80
1	13	100	3,8 ± 0,28	25,5 ± 0,84
0,1	9	100	3,7 ± 0,35	25,8 ± 0,92

*Estadísticamente diferente del control ($p < 0,05$)

El número de embriones vivos a partir de la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ fue significativamente reducido (Fig. 1). La morfología embrionaria fue comparable a la de los controles, no observándose malformaciones ni en las mayores concentraciones evaluadas.



Fig. 1a



Fig. 1b



Fig. 1c

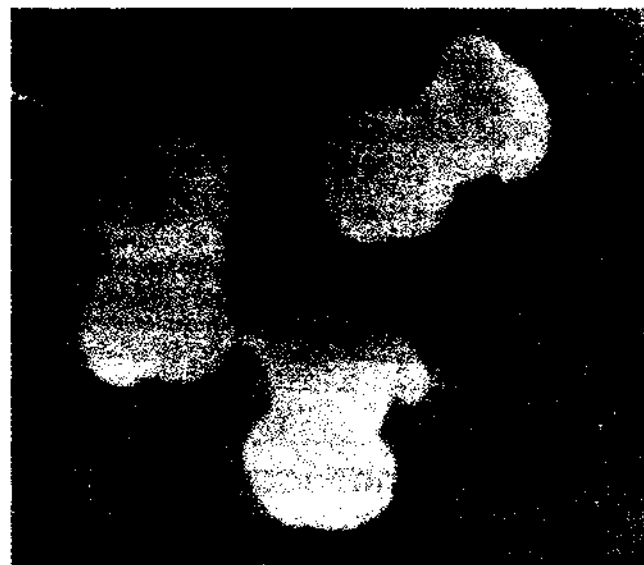


Fig. 1d

Fig. 1. Embriones de rata de 10 d después de 24 h en cultivo. (a) control; (b) 15 mg/mL; (c) 30 mg/mL; (d) 50 mg/mL. En las figuras c y d los embriones se encuentran en el interior de sus membranas

La longitud cráneo-caudal y el número de somitas mostraron un decremento dependiente de la concentración del producto en el medio de cultivo. Estos parámetros de crecimiento y desarrollo se afectaron significativamente ($p < 0,05$) en las concentraciones de 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$.

Estos resultados *in vitro* coinciden con los hallazgos del estudio *in vivo* de este mismo producto en el cual tampoco se detectaron malformaciones pero sí un efecto embriotóxico manifestado en la disminución de la talla y el peso fetales después del tratamiento a las ratas preñadas.⁴ Esta similitud en los resultados es un elemento más a favor del criterio de que el Sistema de Cultivo de Embriones es capaz de reproducir los resultados *in vivo*.⁸⁻⁹

El Sistema de Cultivo de Embriones está siendo ampliamente utilizado en el estudio de mecanismos teratogénicos¹⁰⁻¹³, se encuentra en una fase de estandarización y validación para su aplicación en la evaluación teratogénica a corto plazo.^{7,14,15}

La exposición directa de embriones de rata en cultivo a pesticidas, podría contribuir a la explicación de los resultados contradictorios encontrados al emplear diferentes vías de administración,¹⁶ ya que este modelo permite controlar los efectos maternos sobre los productos que se están experimentando.

En las evaluaciones teratogénicas de pesticidas se usan frecuentemente embriones de aves y reptiles¹⁷ que están expuestos

naturalmente a estas sustancias químicas. El empleo de este Sistema de Cultivo de Embriones permitirá comparar la respuesta de estas especies con los resultados de la exposición directa de embriones de roedores.

BIBLIOGRAFIA

1. Yin-Tak Woo J. *Environ. Sci. Health*, C1, 97, 1983.
2. Macías A., Martín A. y Graupera M. *Pat. Cuba* 34628-A mayo, 1982.
3. Toledo M. y Arruzazabala M. de L. Laboratorio de Farmacología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (comunicación personal), 1985.
4. Friman M. y Rodríguez M.D. Laboratorio de Histopatología y Teratología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (inédito).
5. Petrova-Vergieva and Ivanova-Tchemishanska. *Food Cosmet. Toxicol.*, 11, 239, 1973.
6. New D.A.T. *Biol. Rev.*, 53, 81, 1978.
7. Kitchin K.T., Schmid B.P. and Sanyal M.K. *Meth. and Find Exptl. Clin. Pharmacol.*, 8, 291, 1986.
8. Sadler T.W. and Warner C.W. *Pharmacological Reviews* 36, 145, 1984.
9. Schmid B.P. *Xenobiotica*, 15, 719, 1985.
10. Sadler T.W. *Teratology*, 21, 349, 180.
11. Harris C., Moses J.N. and Judau M.R. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 88, 141, 1987.
12. Freeman S.J. and Lloyd J.B. *Chem. Biol. Interactions*, 58, 149, 1986.
13. Mirkes P.E., Greenaway J.C., Hilton J. and Brundrett R. *Teratology* 32, 241, 1985.
14. Schmid B.P., Trippmacher A. and Bianchi A. *Developments in the Science and Practice of Toxicology*, 563-566, Elsevier Science Publishers B.V., 1983.
15. Klug S., Lewandowski C. and Neubert D. *Arch. Toxicol.*, 58, 84, 1985.
16. Gayni E., Brocchi M.L. and Imara C. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 377, 1986.
17. Maci R. and Arias E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13, 169, 1987.

PRIMER CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APLICACIONES DEL OZONO

31 de octubre al 3 de noviembre de 1990

Ciudad de La Habana, Cuba

La Sociedad Ibero-latinoamericana del Ozono y el Centro Nacional de Investigaciones Científicas le invitan a participar y le aseguran que obtendrá el máximo aprovechamiento del evento.

TEMATICAS

*Ozono en la Medicina
Ozono en la Biología
Química del ozono*

*Tratamiento de aguas
Aplicaciones industriales
Construcción de equipos*

PROGRAMA CIENTIFICO

El Programa Científico consistirá en exposiciones orales (15 min), conferencias (30 min) y discusión de posters. Sesionará una exhibición comercial, donde toda firma interesada podrá participar.

CORRESPONDENCIA

Dr. Manuel Gómez Moraleda
I CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APLICACIONES DEL OZONO
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ave. 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
Apatado Postal 6990
Ciudad de La Habana, Cuba
Télex: 51 1582 CNIC CU