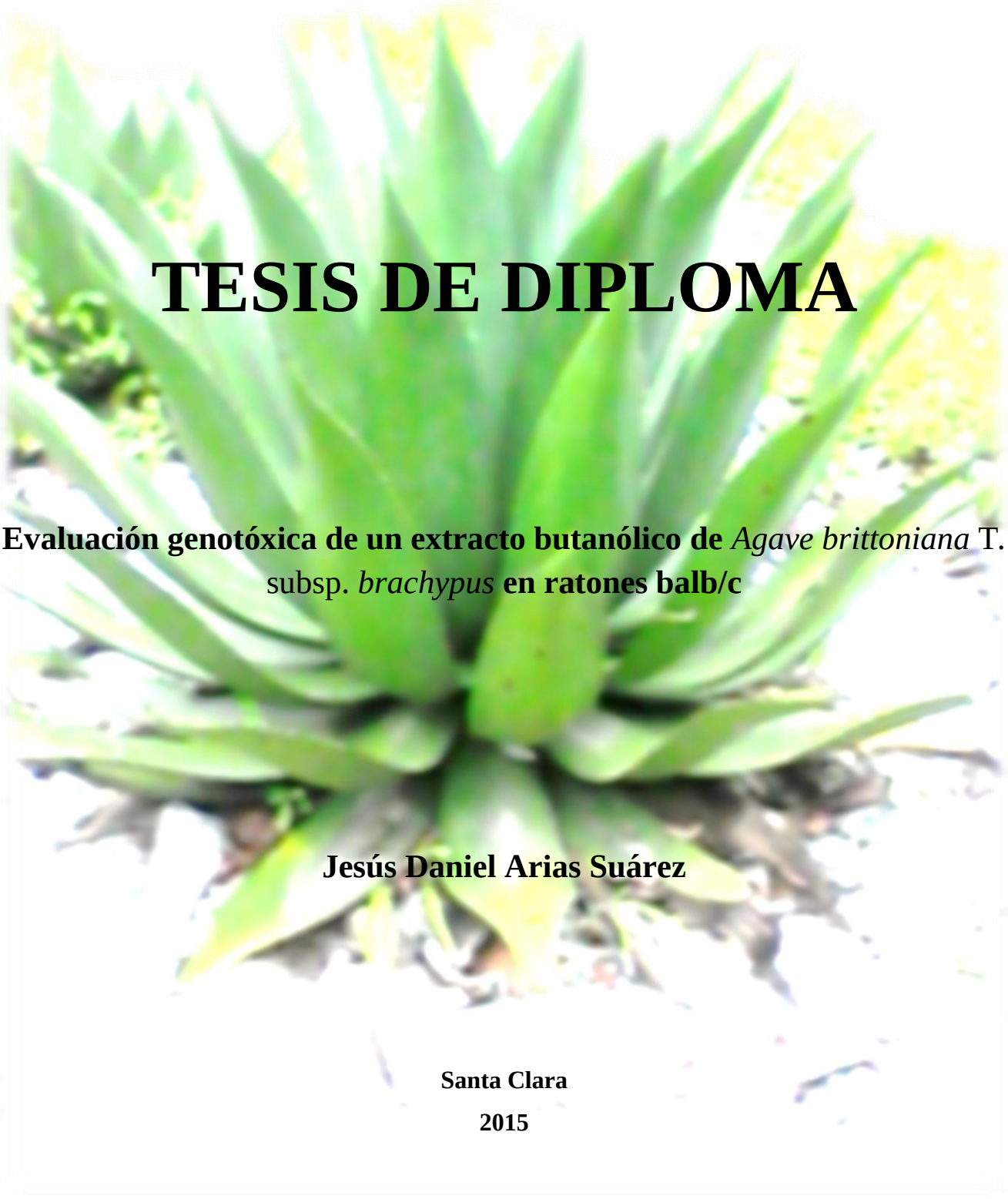
Universidad Central "*Marta Abreu*" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología



TESIS DE DIPLOMA

Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* **en ratones balb/c**

Jesús Daniel Arias Suárez

Santa Clara

2015

Universidad Central "*Marta Abreu*" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* en ratones balb/c

Autor:

Jesús Daniel Arias Suárez

Tutor:

Lic. Rinier Coca Gutiérrez

Centro de Toxicología (CENTOX). Universidad de Ciencias Médicas
de Villa Clara: "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz"
Circunvalación y carretera del acueducto. Santa Clara.
riniercg@ucm.vsl.sld.cu

Profesores consultantes:

MSc. Arianna Valido Díaz
Dr.MVZ Daniel Francisco Arencibia Arrebola

Santa Clara
2015

"See the world not as it is, but as it should be"

Finn Hudson

(Cory Monteith)

A mi **T**ierno e **I**ncreíble **T**rozo de **I**lusiones

A mi familia (mi tío-papá, mi mamá y mi abuelito)

A mi ángel de la guarda en el cielo (mi abuela)

AGRADECIEMIENTOS

El camino ha sido largo y difícil en toda la trayectoria de mi vida. Sin embargo, existen esas pequeñas pero a la vez gigantes personas que han hecho de mi mundo un camino más luminoso y lleno de sentido. Albert Einstein me enseñó que existe una fuerza mayor que el vapor, la electricidad y la energía atómica; la Voluntad.

La voluntad de seguir adelante ante circunstancias dolorosas, tristes y escasas de triunfo, esa voluntad que me ha hecho ser más fuerte con el apoyo de todos aquellos que han donado un minuto de su tiempo para hacerme un poco más feliz. Por eso quiero agradecer hoy más que nunca a los que han sabido actuar junto a mí en la obra de teatro más importante: mi vida. En primer lugar debo hablar de mi familia, sería divertido decir que es un dibujo animado lleno de comedia pero a la vez de tristezas, esas que me han hecho tan fuerte y me han empinado con temple a enfrentar mi futuro. Mi tío se ha convertido en mi padre, sus consejos, su cariño, su apoyo incondicional en todo momento, su abrazo cálido y fuerte que me guía el camino día a día. Mi mamá, les puedo asegurar que no se parece a ninguna otra, es especial, débil aparentemente, trastornada hasta cierto punto, pero tan pegada a mí que se podría decir que somos hermanos gemelos en vez de madre e hijo. Mi abuelito, que respira a cada paso que doy, que asegura que soy el marcapaso de la corta vida que dice le queda ya y a mi abuelita, la que no vive conmigo, pues se encarga de que todas las noches las estrellas alumbren para mi desde el cielo para que nunca desista de luchar por cada sueño que tenga.

A aquella persona que me ha enseñado que se puede amar sin límites, que los gatos son tiernos y que cuando todo parece estar perdido siempre habrá alguien quien quiera darme su mano sin pedir nada a cambio, que la vida no se mide por las horas que respiras sino que los segundos que te quitan el aliento y que los marpacíficos sí pueden ser azules, un beso muy grande. A mis grandes amigos, a la rockera de mis sueños: Jennifer por confiar en mí y enseñarme a caminar por el mundo como debe ser, a Yoandry, a Manuel y a Adrián el oriental, mi clon espiritual. A José Rey, a Félix, a las niñas de mi aula que son maravillosas, a Alianny y a Raúl (Cuti). En fin, a todos aquellos amigos que quizás no pueda mencionar porque la nostalgia me inunde, gracias por haber vivido momentos maravillosos conmigo. A mis profes: Idelfonso, cómo olvidarlo, Maritza (ejemplar), Alejandro Pérez, Dianella, Katia, Elizabeth, Orelvis, Florentino (el grande), Alan, Alexei, Maroto, Lourdes (inigualable), gracias a todos por formar en mí lo que soy hoy.

A mis tutores, el Rini, uno de mis grandes ejemplos desde que lo conocí en primer año, por su apoyo, su confianza y su seguridad en que yo podría defender con firmeza un proyecto como este. A Arianna, que a pesar de su olvidadizo cerebro se encargó de apoyarme en todo lo necesario y a toda hora para que este momento se diera. A Daniel, un gran ejemplo a seguir por tener una vida tan complicada y estar tan lejos de mí y aun así decidir apoyarme incondicionalmente en todo para que mi tesis fuera un éxito. A todo el equipo de trabajo del CENTOX y de Ciencias Médicas en general que me apoyaron incondicionalmente; Yisel, Freisman, Roanmi, Pedro, Claudia, Liuba, Arelia, Yilka, Edel, el doctor Yoamel, Carmen. A José Orestes del Departamento de Química de la UCLV, a Gladys Casa del Departamento de Bioinformática del Centro de Estudios Informáticos por su asesoramiento estadístico a toda hora, a María Magdalena mi querida profe de Química Orgánica y en especial al apoyo de mi oponente María Boffil.

A Martica, una persona recién llegada a mi entorno pero que se ha convertido en un bastón para mí, enseñándome que en la vida se puede luchar hasta el cansancio y que detrás de una decepción viene otra pero que hay que enfrentarlas con ganas de vencer, a Alexander por hacerme sonreír tanto. Gracias a todos ellos y a todos los que se me queden por mencionar, muchísimas gracias por forjar a este hombre de ciencia, el que va a trabajar duro por ver triunfar a otros como yo. Y para todos los que no creyeron en mí también tengo un mensaje, gracias por darme un tema de qué preocuparme, sólo recuerden que yo nunca dejaré de luchar porque el futuro es incierto y la vida sigue infinitamente aún después de nuestra muerte física; y cuando ya no pueda luchar no más que con mi imaginación, haré mías las palabras de la afamada escritora Frida Kahlo*: "…pies, para que los quiero, si tengo alas para volar…"*.

RESUMEN

La especie *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* es endémica de la región central del país y se le reconocen un conjunto de metabolitos que le confieren actividad antiparasitaria, antiinflamatoria y antifúngica. El mayor por ciento de estos metabolitos lo constituyen las saponinas, las cuales son reconocidas por su toxicidad en los organismos. Sin embargo, poco se ha investigado en relación a su influencia en el material genético. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el potencial genotóxico de la administración de un extracto butanólico de esta especie, utilizando el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea y de Sangre Periférica en ratones balb/c de ambos sexos administrados durante 14 días por vía oral a dosis repetidas (1 y 5 mg/Kg). Como control positivo fue utilizado la Ciclofosfamida, mutágeno altamente empleado en los estudios de este tipo. Además, se analizó el peso corporal como variable de salud. En el ensayo de micronúcleos, el extracto no resultó citotóxico, no aumentó la frecuencia de células en médula ósea con micronúcleos, ni la frecuencia de reticulocitos micronucleados en sangre periférica. Aun así, el extracto administrado a 5mg/Kg evidenció una tendencia hacia los valores del control positivo. De forma general, el comportamiento del peso corporal de los ratones fue el esperado para el modelo y el extracto. Los resultados demostraron que el extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* no es genotóxico para ninguno de los dos ensayos aplicados según las condiciones de laboratorio, las dosis evaluadas y el modelo seleccionado.

Palabras Claves: agave, genotoxicidad, médula ósea, micronúcleos, sangre periférica.

ABSTRACT

The species *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus*, is endemic to central region of the country and it is recognized a set of metabolites that give anti-parasitic, anti-inflammatory and antifungal activity. The highest percentage of these metabolites is the saponins, which are known for their toxicity to organisms. However, little has been investigated in relation to their influence on the genetic material. Therefore, the aim of this work was to evaluate the genotoxic potential of the administration of a butanol extract of this species, using the micronucleus assay bone marrow and peripheral blood in balb/c mice of both sexes administered for 14 days to repeated oral doses (1 and 5 mg/Kg). As positive control was used Cyclophosphamide, highly mutagen used in studies of this type. In addition, body weight like health variable was analyzed. In the micronucleus test, the extract was not cytotoxic, did not increase the frequency of bone marrow cells with micronuclei, and the frequency of micronucleated reticulocytes in peripheral blood. Still, the extract administered to 5 mg/Kg evidenced a trend toward the values of the positive control. In general, the behavior of the body weight of mice it was expected for the model and extract. The results showed that the butanol extract of *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* is not genotoxic in any tests applied under laboratory conditions, the doses evaluated and selected model.

Keywords: agave, bone marrow, genotoxicity, micronucleus, peripheral blood

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

TABLA DE CONTENIDOS ..... **III**

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN **1**

Hipótesis de investigación 2
Objetivo general 2
Objetivos específicos 2

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **3**

2.1. Evaluaciones toxicológicas preclínicas 3
2.2. Toxicología genética 4
2.3. Los agentes genotóxicos y su influencia en el material genético 6
2.4. Ensayos de genotoxicidad. Generalidades 9
2.4.1. Estrategias regulatorias en los ensayos de genotoxicidad 10
2.5. Ensayo de Micronúcleos 11
2.7.1. Características de los micronúcleos 13
2.7.2. Agentes micronucleogénicos. Mecanismos de acción 14
2.7.3. Utilidad del Ensayo de Micronúcleos como medida de inestabilidad genética 15
2.6. Mecanismo de acción de los mutágenos más utilizados en ensayos de genotoxicidad *in vivo*. 16
2.6.1. Mecanismo mutagénico de la Ciclofosfamida 17
2.7. Descripción y caracterización del género *Agave* 18
2.8. Antecedentes en el estudio químico y farmacognóstico del género *Agave* 19

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS **22**

3.1. Recolección, preparación y obtención del extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. 22
3.2. Aspectos éticos con el uso de animales de laboratorio 23
3.3. Animales 23
3.4. Condiciones de tenencia y alimentación 23
3.5. Diseño experimental 23
3.6. Clínica 24
3.7. Medición del peso corporal 25
3.8. Técnicas citogenéticas realizadas 25
3.8.1. Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea de ratón 25
3.8.2. Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica de ratón 25
3.9. Eutanasia 26
3.10. Análisis estadístico 26

CAPÍTULO 4. RESULTADOS **27**

4.1. Evaluación del peso corporal de los ratones balb/c en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea y Sangre Periférica 27

4.2. Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea 30
4.3. Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica 34

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN 37

5.1. Efecto de la administración oral del extracto butanólico de *Agave Brittoniana* subsp. *brachypus* en el peso corporal de ratones balb/c..... 37
5.2. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* en el Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea en ratones balb/c..... 38
5.3. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto butanólico de *Agave Brittoniana* subsp. *brachypus* en el Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica en ratones balb/c. 40

CONCLUSIONES.....42

RECOMENDACIONES.....43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44

ANEXOS.....51

CAPÍTULO 1.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La principal importancia de la Medicina Natural se evidencia a través del tratamiento de la persona y no solamente de la enfermedad. Generalmente, los químicos usados en la elaboración de medicamentos curan un padecimiento en un corto periodo de tiempo pero pueden perjudicar otros órganos sensibles del cuerpo, por lo que su uso constante no siempre es recomendable. La utilización de la medicina natural frente a su alternativa química, se remonta a muchos siglos antes de que apareciera la ciencia y para muchas personas representa una opción viable en el tratamiento de enfermedades poco peligrosas.

Los agaves forman parte de las plantas ampliamente utilizadas en el tratamiento de dolencias. De ellos se destaca su utilización en el tratamiento de gastritis y úlceras debido a sus propiedades antisépticas externas e internas, disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos, mejora la eliminación de toxinas en el cuerpo y se recomienda su uso en la tuberculosis, enfermedades hepáticas y la ictericia. En Cuba, se han identificado 18 especies, siendo el *Agave brittoniana* T. endémica de la región central del país y que cuenta con las subespecies *A. brittoniana* T. subsp. *spirituana* y *A. brittoniana* T. subsp. *brachypus*. (CECMED, 2012).

La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad en biomodelos experimentales con el fin de predecir su comportamiento en humanos. Sin dudas, una buena parte de estos productos están vinculados a fármacos y productos naturales que se utilizan en el tratamiento de enfermedades. Como parte de los estudios de toxicidad, se desarrollan los ensayos de genotoxicidad debido a la necesidad de determinar el grado de daño al material genético que pueda causar la sustancia administrada.

Dentro de los ensayos genotóxicos *in vivo* más utilizados se encuentra el Ensayo de los Micronúcleos tanto en médula ósea como en sangre periférica. El resultado de numerosos trabajos demostró que varios complejos químicos incrementan de modo significativo el número de micronúcleos (Zalacain *et al.,* 2005). Por tanto, el recuento de micronúcleos como medida de daño cromosómico permite que de forma rápida y certera se pueda detectar el nivel de toxicidad que pueda presentar la célula u órgano diana en cuestión e incluso determinar los agentes mutagénicos causantes de tal desorden genético.

Según estudios fitoquímicos realizados en *A. brittoniana* T. subsp. *brachypus*, se ha determinado que las saponinas y azúcares reductores son los componentes que en mayor concentración se encuentran en esta especie (Guerra, 2005). En el caso de las saponinas, se han efectuado varios estudios que demuestran su toxicidad (Paredes y Enrique, 2010, Thakur *et al.*, 2011, Mwale *et al.*, 2013), pero poco se ha estudiado en relación a su efecto en el material genético, en cuyo caso se ha establecido la no genotoxicidad de estas (Marczewska *et al.*, 2011, Moreira *et al.*, 2013). No obstante, en estudios recientes se ha probado que existe daño genético en la administración de extractos con altos niveles de saponinas, tanto aisladas o mezcladas con otras (Liu *et al.*, 2011, Kalachaveedu *et al.*, 2014). Por lo anterior, se define la siguiente

Hipótesis de investigación

- El extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* administrado a ratones balb/c durante 14 días, por vía oral en dosis de 1 y 5 mg/kg, no es genotóxico en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea y de Sangre Periférica.

En consideración a lo expuesto previamente se traza el siguiente

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico *in vivo* de la administración oral de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* en ratones balb/c, utilizando el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea y Sangre Periférica.

Metodológicamente este objetivo fue abordado en los siguientes

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto genotóxico de la administración oral durante 14 días de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* en eritrocitos de médula ósea de ratones balb/c mediante el Ensayo de Micronúcleos.
2. Evaluar el efecto genotóxico de la administración oral durante 14 días de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* en reticulocitos de sangre periférica de ratones balb/c mediante el Ensayo de Micronúcleos.

CAPÍTULO 2.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evaluaciones toxicológicas preclínicas

En la actualidad, la mayoría de la atención médica culmina con la prescripción de un medicamento. Todo comienza con la identificación de un principio activo que ofrezca la solución al problema que se intenta resolver. Antes de efectuar cualquier tipo de evaluación toxicológica sobre estos, ya se debe conocer su efecto farmacológico principal y secundario derivados de las interrelaciones en su mecanismo de acción dentro del organismo; así como la dosis en la cual ocurren dichos efectos. Por ello, la primera dosis a evaluar en los estudios de toxicología es la dosis farmacológica, conociéndose con antelación la farmacocinética y farmacodinamia del principio activo, todo con el objetivo de determinar el grado de seguridad de su utilización en humanos.

La realización de un conjunto de estudios toxicológicos en diferentes especies de animales permite identificar la toxicidad intrínseca, así como los órganos y tejidos diana de la toxicidad relacionada con el compuesto en evaluación. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y destino final del producto, pero en la generalidad de los casos, el objetivo debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicología aguda), administraciones repetidas (subcrónica y crónica) y estudios especiales de genotoxicidad, toxicología de la reproducción y la fertilidad, llegando incluso en muchos casos a ser necesario la evaluación de su potencial carcinogénico (Baber, 1994, Garthoff, 1995, CECMED., 2001).

La toxicología se define como el estudio de los efectos adversos de agentes químicos, físicos o biológicos en organismos vivos y ecosistemas y está basado en el principio del siglo XVI que cualquier sustancia puede ser tóxica si es consumida en cantidad suficiente (Repetto M. y G., 2009).

El estudio de la toxicidad aguda, o de dosis únicas, evalúa la toxicidad inducida por la droga sujeta a estudio como resultado de la administración de dosis altas, ya sea por la administración única o repetida en un intervalo no mayor de 24 horas (Botham, 2002), brindando información intrínseca del producto y el posible riesgo que conlleva su exposición aguda. Además, aporta valiosa información para la selección de los niveles de dosis a emplear en los estudios subcrónicos (Arencibia, 2015).

La selección de los niveles de dosis ha sufrido variaciones con la introducción de estos nuevos métodos. La dosis de 5000 mg/kg, nivel aceptado durante mucho tiempo como dosis máxima, desde

diciembre de 2001 se ha reducido a 2000 mg/kg en el método de las Clases, el Test Límite y el Método Arriba y Abajo, aunque sigue siendo la dosis máxima de elección en el Método de la Dosis Fijada.

A los resultados de los estudios de dosis única le sigue la realización de estudios de administración continuada, con diseños subagudos, subcrónicos y crónicos. En el primero de ellos se estudian los efectos tóxicos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, generalmente entre 14 y 30 días (Gámez, 2007, Arencibia, 2015). En la toxicidad subcrónica se analizan los efectos adversos por la toxicidad acumulada de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa aproximadamente el 10% de la vida del animal. Los ensayos crónicos se realizan con el objetivo de determinar el potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración. La máxima dosis a emplear debe inducir signos de toxicidad sin que ponga en peligro la supervivencia de los animales, para lo cual es necesario basarse en los hallazgos indicativos de toxicidad del estudio subcrónico precedente. Por su parte, la dosis menor no debe inducir evidencias de toxicidad, mientras que en la dosis intermedia se debe manifestar una disminución de los síntomas y signos indicativos de toxicidad observados en la dosis mayor (Gámez, 2007).

Dentro de los estudios toxicológicos se pueden incluir además ensayos *in vitro* para detectar alteraciones de las funciones celulares básicas, debido a la exposición a un compuesto prueba que conlleve daño celular. Una vez determinado la existencia de daño citotóxico es importante determinar si existe genotoxicidad a partir de la administración del compuesto.

Los otros estudios a realizar en la toxicología preclínica son aquellos encaminados a evaluar el efecto de la sustancia prueba sobre la fertilidad, su potencial teratogénico y su efecto peri-postnatal. Finalmente, los estudios de carcinogénesis se encargan de determinar si la sustancia ensayo tienen un efecto promotor de tumores, ya sea por afectar factores de crecimiento o activar oncogenes como resultado de una prolongada acción e incremento de la concentración de la sustancia o sus metabolitos en tejidos susceptibles (Boada, 2004).

2.2. Toxicología genética

La justificación inicial para las pruebas genéticas fue articulada por Alexander Hollaender a finales de 1960, al fundar la Sociedad de Mutágenos Ambientales (Brusick, 1999). Desde entonces, la identificación de la mutagenicidad potencial de los químicos ambientales, así como la valoración del

riesgo mutagénico de productos químicos industriales se han convertido en uno de los objetivos más importantes de la toxicología genética.

La toxicología genética es, por definición, el estudio de la forma en que agentes químicos o físicos afectan al proceso de la herencia. Las sustancias químicas genotóxicas son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas. La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de esta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células. El principal objetivo de la toxicología genética es la valoración de la habilidad de los compuestos químicos para inducir mutaciones en las células humanas. No obstante, está claro que es imposible valorar directamente el riesgo mutagénico de los compuestos químicos en los humanos, por lo que se hace necesaria la generación de una amplia variedad de métodos de prueba con ese fin. Estos métodos son conocidos como batería de ensayos y los biomarcadores que comúnmente se utilizan son microorganismos, células *in vitro* de humanos y de otros mamíferos, modelos de plantas y animales de laboratorio (Misra y Waalkes, 2001).

La replicación y reparación del ADN no es un proceso perfecto, y en raras ocasiones, ocurren daños genéticos (Brusick, 1999). El daño al ADN puede ser dividido en varias categorías basado en la naturaleza del ADN modificado:

A. Daños de alteración del ADN: Involucra la rotura y/o intercambio de segmentos de ADN entre las estructuras de los cromosomas. Este tipo de daño puede ser visible a través de análisis citológico de cromosomas condensados. Aunque las genotoxinas (como los agentes alquilantes) inducen alteraciones del ADN, una ocurrencia de este tipo puede ser causada también por mecanismos secundarios que específicamente no están enfocados en el ácido nucleico (*e.g.* procesos que conducen a un stress celular, tales como altas temperaturas)

B. Microlesiones: Son alteraciones no visibles que ocurren a nivel de nucleótidos. Generalmente, este tipo de daño produce puntos de mutaciones a través de la sustitución, eliminación o inserción de pares de bases o puede inducir una recombinación entre cromátidas hermanas. Las microlesiones son generalmente inducidas por agentes cuyo objetivo es el ácido nucleico *(e.g.*, agentes electrofílicos)

En la mayoría de los organismos, los daños en el ADN ocurren en una razón predecible para cada gen (*op. cit.).* Sin embargo, otros daños pueden ser producidos por agentes endógenos y exógenos que interactúan con el ADN y por ello son clasificados como genotóxicos. Algunos ejemplos de agentes endógenos son los radicales libres, los peróxidos producidos durante el metabolismo oxidativo y los aldehídos y cetonas producidas biológicamente.

2.3. Los agentes genotóxicos y su influencia en el material genético

Debido a su relativa abundancia en las células, las proteínas son la diana más frecuente de la interacción tóxica. No obstante, preocupa más la modificación del ADN por la importante misión de éste como regulador del crecimiento y la diferenciación a lo largo de múltiples generaciones de células. A nivel molecular, los compuestos electrófilos tienden a atacar al oxígeno y el nitrógeno del ADN. Aunque también son dianas de la modificación química los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto del ADN, se estima que tiene más importancia biológica el daño a las bases, ya que estos grupos están considerados como los elementos primarios de información de la molécula de ADN (Misra y Waalkes, 2001).

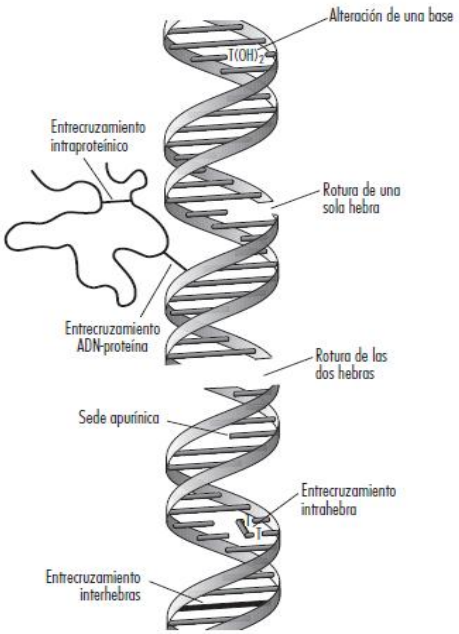


Figura 1. Tipos de daño al complejo ADN-proteína. Fuente: (Misra y Waalkes, 2001)

Es característico que los compuestos que contienen una sola unidad electrófila causen la genotoxicidad produciendo monoaductos en el ADN. Análogamente, los compuestos que contienen dos o más unidades reactivas pueden reaccionar con dos centros nucleófilos distintos y de esa manera producir

entrecruzamientos intra o intermoleculares en el material genético (Fig. 1). Los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína pueden ser especialmente citotóxicos, pues pueden formar bloques completos para la replicación del ADN. Los agentes genotóxicos pueden actuar también induciendo roturas en el esqueleto fosfodiéster, o entre bases y azúcares del ADN.

Los agentes genotóxicos pueden ser agentes físicos (luz ultravioleta (UV), radiaciones ionizantes, entre otros) o productos químicos (como los agentes alquilantes, metales, pesticidas, entre otros) capaces de alterar la información genética celular. En cada una de estas sustancias, se efectúan varios mecanismos a través de los cuales se fortalece su efecto sobre el material genético.

Uno de los agentes mutagénicos más efectivos en bacterias es la radiación UV de longitud de onda corta. La longitud de onda efectiva para la mutagénesis está comprendida entre los 200 y 300 nm. El mecanismo más importante de la acción de la luz UV es la formación de dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) entre pirimidinas adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación, la polimerasa de ADN inserte un nucleótido incorrecto. Tales dímeros distorsionan la hélice de DNA e impiden su replicación, como resultado la célula no se divide y puede morir (Hartl y Jones, 1998).

Las radiaciones ionizantes son formas de radiación más potente, e incluyen rayos de longitud de onda corta, como los rayos X, emisiones de elementos radioactivos, y rayos *gamma*. Estas radiaciones causan la ionización del agua y de otras sustancias; produciéndose indirectamente efectos mutagénicos debido a esta ionización (Benavides y Guénet, 2003). Como la mayor parte de la célula está constituida por agua, la radiación ionizante suele generar radicales libres, en forma de hidrógeno o de radicales hidroxilo (OH^-) ionizados, derivados ambos del agua. Estos radicales reaccionan con otras moléculas de su misma clase para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cuyas moléculas tienen gran poder de reacción y pueden destruir la estructura de las proteínas y del ADN. La lesión producida por la radiación induce trastornos del funcionamiento de los procesos metabólicos celulares llevándola a la muerte.

La genetista escocesa Charlotte Auerbach fue la primera en demostrar, en la década del ‘60, el peligro que representaba la utilización de un agente químico (el “gas mostaza”) para las personas, debido a su fuerte actividad mutagénica. Actualmente, se conocen varios productos químicos que son mutagénicos, clasificándose según su modo de acción en (Benavides y Guénet, 2003):

- Análogos de bases: Se incorporan en el ADN (durante la replicación) en lugar de las bases correspondientes, debido a su alta similitud. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el ADN, la replicación sigue normalmente, aunque a veces ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas. Algunos ejemplos de estos agentes son, la 6-amino purina que se incorpora en el ADN en lugar de las bases "oficiales" (A, T, G y C), lo que provoca transversiones o transiciones en las futuras replicaciones del ADN.
- Agentes intercalantes: Son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdeleciones, originando mutaciones por corrimiento de lectura. Ejemplos de estos agentes intercalantes son el naranja de acridina, el bromuro de etidio y la proflavina.
- Agentes que reaccionan con el ADN: Son agentes químicos que reaccionan directamente con el ADN que no se está replicando, ocasionando cambios químicos en las bases al momento de la replicación. Entre ellos se encuentra el ácido nitroso (HNO_2), la hidroxilamina (NH_2OH) y los agentes alquilantes. Dentro de este último se destacan los compuestos etil metano sulfonato (EMS), etiletanosulfonato, mostaza nitrogenada. El etil metano sulfonato (EMS) introduce un metilo en la guanina provocando la transición GC a AT. El ácido nitroso elimina el grupo amino (desaminación) de adenina y citosina, convirtiendo estas bases en hipoxantina (H) y uracilo (U), respectivamente. Hidroxilamina añade un grupo hidroxilo (OH) al grupo amino de la citosina, haciendo que la base sufra un cambio tautomérico. En el caso de la mostaza nitrogenada, se pueden producir mutaciones por adición de grupos metilo o etilo a la guanina, haciendo que se comporte como un análogo de base de la adenina y dando lugar a errores de apareamiento.

En el caso particular de los metales se destaca el cromo, siendo un metal esencial en cantidades muy pequeñas para los seres vivos; en el organismo se transforma de cromo VI a cromo III. En cantidades elevadas este metal interactúa con los ácidos nucleicos produciendo micro y macrolesiones, sarcomas, carcinomas y adenocarcinomas. En la Tabla I se pueden observar los efectos genotóxicos de algunos metales pesados.

A pesar de los efectos beneficiosos asociados al uso de plaguicidas, muchos de estos productos químicos pueden presentar peligros potenciales para el medio ambiente y la salud humana (Matheus y Bolaños, 2014).

Tabla I. Algunos metales pesados y sus efectos genotóxicos en los seres vivos. Fuente: (Arencibia, 2014)

Metal	Efecto genotóxico
Arsénico	Cáncer de piel, efectos sobre la reproducción, mutagénico
Cadmio	Mutagénico, sarcomas.
Níquel	Cáncer pulmonar, mutagénico
Plomo	Anemia, linfomas, carcinomas y sarcomas renales, mutagénico

En este sentido, existen evidencias del impacto potencial de los plaguicidas como disruptores endocrinos en la función reproductiva masculina, pudiendo causar daños en la cromatina de los espermatozoides, disminuyendo la calidad del semen y produciendo alteraciones de las hormonas masculinas que pueden conducir a resultados adversos (Miranda *et al.*, 2013). Recientemente, revisiones bibliográficas han recopilado una variedad de publicaciones que relacionan diferentes tipos de neoplasias: leucemia, mielomas, melanomas, cáncer de pulmón, colón, recto, páncreas, vejiga con los distintos grupos de plaguicidas (Weichenthal *et al.*, 2010, Mostafalou y Abdollahi, 2013).

2.4. Ensayos de genotoxicidad. Generalidades

Formalmente, la genotoxicidad puede definirse como la capacidad para causar daño al material genético, incluyendo tanto al ADN como a aquellos componentes celulares que están relacionados con las funciones y el proceder de los cromosomas dentro de la propia célula. (AETOX, 2014).

Para realizar la correcta evaluación genotóxica se diseñan los ensayos de genotoxicidad con el objetivo de detectar el daño originado al material genético. En la actualidad, no existe un test específico para detectar todos los tipos de mutaciones que pueden ocurrir, por lo que se establece la realización de una batería de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en dependencia del mecanismo biológico que se desee analizar.

Los estudios genotóxicos *in vitro* garantizan la detección del potencial mutagénico de numerosos compuestos. (Arencibia *et al.*, 2009). Dentro de estos estudios se destacan el ensayo de Ames, el de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, el ensayo de la Fracción microsomal de hígado de rata y el ensayo cometa. Respectivamente, cada uno se encarga de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura

(*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN, detectar los agentes que pueden provocar cambios en la estructura de los cromosomas, detectar sustancias promutagénicas y detectar el daño al ADN en células individuales, mostrando las rupturas de cadena y sitios lábiles al álcali en el ADN, al cuantificar la migración del ADN (Tice *et al.*, 2000, Villasana, 2008, Arencibia, 2014).

Todas estas técnicas son altamente utilizadas y confiables para detectar todo índice de genotoxicidad en los seres vivos pero está regulado por la OECD[1] que en todos los ensayos *in vitro* a desarrollarse durante una investigación es imprescindible utilizar un sistema de activación metabólica exógeno para lograr reproducir todas las condiciones *in vivo* que se dan en los organismos de evaluación.

Por esta razón, los ensayos *in vivo* son también de vital importancia pues los experimentos desarrollados directamente en animales sugieren que resultados similares pueden suceder en los humanos. En la actualidad no se ha logrado suplantar su utilización por otras técnicas de la toxicología experimental; no obstante, se han tomado alternativas para evitar el sufrimiento y el uso descuidado de los animales en las investigaciones como es la aplicación del principio de las "3R"; refinamiento, reducción y reemplazo.

Dentro de los ensayos *in vivo* más utilizados se pueden mencionar el ensayo Cometa que se utiliza en gran medida para determinar el nivel de afectación que puede producirse en la estructura primaria del ADN. También constituye en estudio importante el ensayo Morfología de la Cabeza del Espermatozoide de ratón, el cual se efectúa a través del análisis de anomalías que se pueden presentar en la cabeza de los espermatozoides de los animales que se usen como patrón. Uno de los ensayos más certeros a la hora de detectar el daño a nivel de cromosoma es el de la aparición de micronúcleos; tanto en médula ósea, como en sangre periférica de animales (por lo general roedores).

2.4.1. Estrategias regulatorias en los ensayos de genotoxicidad

Los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías; la que se propone para su uso en humanos y otra que por lo general es la vía intraperitoneal. Las autoridades regulatorias como la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) y EPA

[1] Del ingles, *Organization for Economic Co-operation and Development*

(Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos), exigen un ensayo *in vitro* que determine daño a nivel de genes (de ser posible el Ensayo de Ames) y un ensayo *in vivo* que determine daño a nivel de los cromosomas (se recomienda el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de ratones para realizar la solicitud de ensayo clínico fase I) en voluntarios sanos (Arencibia, 2014).

En aquellos organismos que están expuestos por largos periodos de tiempo, se recomiendan realizar estudios de carcinogénesis. Estos estudios tienen por objeto determinar si la sustancia ensayo tiene un efecto promotor de tumores, ya sea por afectar factores de crecimiento, o activar oncogenes como resultado de una prolongada acción e incremento de la concentración de la sustancia o sus metabolitos en tejidos susceptibles (Gámez, 2007). En su evaluación se emplea la misma vía de administración que en la práctica médica. El ensayo más ampliamente empleado es el tratamiento crónico en roedores, con una duración de 24 meses en ratas y 18 meses en ratones, siendo las líneas de ratas más empleadas la Fischer y la Sprague Dawley; mientras que las líneas de ratones son B6C3F1, CD-1 y OF-1 (Chhabra *et al.*, 1990, Piccirillo, 1999).

2.5. Ensayo de Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) fueron utilizados por primera vez por H.J. Evans, para cuantificar el daño cromosómico en las puntas de las raíces de la haba, *Vicia faba* L. Subsecuentemente, el ensayo *in vivo* fue desarrollado independientemente por W. Schmid y J.A. Heddle y sus colegas. La primera propuesta del uso de los micronúcleos en cultivos de células fue por Countryman y Heddle en 1976, en cultivos de linfocitos humanos. Más tarde fue mejorado por Fenech y Morley en 1985 al desarrollar la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*), en la que hacen uso del agente químico citocalasina-B que impide la citocinesis celular.

La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, entre otros.

Cuando los eritoblastos se transforman en eritrocitos policromáticos (EPC), el núcleo principal es eliminado y los micronúcleos se forman a partir de cualquier resto de este dejado en el citoplasma. Debido a esto la visualización de los micronúcleos es más fácil (Arencibia *et al.*, 2009). Un incremento

en la frecuencia de los eritrocitos policromáticos micronucleados en animales tratados es un indicio de daño inducido a los cromosomas.

Según las pautas establecidas por la OECD para las pruebas de químicos en cada grupo de control tratado debe incluirse al menos cinco animales en cada grupo (OECD, 1997). En general, se deben usar los dos sexos, pero si existe alguna evidencia que indique relevantes diferencias en la toxicidad (observaciones clínicas, peso corporal y o patologías que indiquen que un sexo es más susceptible que otro), entonces debe ser usado el sexo en que sea más susceptible. Normalmente, la administración de las dosis debe hacerse por la misma vía en la que será administrada la sustancia en humanos. La prueba puede ser ejecutada en ratas o ratones de dos formas:

- Las muestras de la médula ósea son tomadas al menos dos veces (de grupos independientes de animales), iniciando no antes de las 24 horas después del tratamiento, pero no más allá de las 48 horas. Cuando una respuesta positiva es detectada en una toma de muestra, no es necesario efectuar otras adicionales a menos que se requiera información cuantitativa de la respuesta a la dosis.
- Si se tratan los animales por dos o más días (*e.g*. dos o más tratamientos en intervalos de 24 horas), las muestras deben ser tomadas una vez entre las 18 y las 24 horas seguidas del tratamiento final.

Las células de la médula ósea son usualmente obtenidas del fémur o la tibia de los animales, inmediatamente después de la eutanasia. Comúnmente, las células son removidas, preparadas y teñidas usando los métodos establecidos (Naranja de Acridina o Giemsa). Las láminas pueden ser codificadas por dos observadores independientes de forma "ciega" promediando el resultado final. Se contabiliza la presencia de EPC y eritrocitos normocromáticos (ENC) en al menos 500 célula/animal para las muestras de médula ósea y en 2 000 para muestras de sangre periférica. Para analizar la genotoxicidad se puede calcular la frecuencia de EPC portadores de micronúcleos en las cantidades analizadas anteriormente y calcular el índice de citotoxicidad dado por la relación de EPC/ENC de la población total de eritrocitos y el número de EPC con uno, dos y más de dos micronúcleos en cada grupo para determinar el grado de genotoxicidad (Arencibia *et al.*, 2011b).

2.5.1. Características de los micronúcleos

Los micronúcleos constituyen aglomeraciones de cromatina que adquieren forma de pequeños núcleos. Son cuerpos extranucleares que se forman durante la mitosis en la transición de la etapa metafase a la anafase debido a errores durante la replicación, la posterior división del ADN, roturas cromosómicas o efectos propios de la radiación y sustancias genotóxicas. Estos micronúcleos no logran incorporarse al núcleo de las células hijas, lo que trae como consecuencia una pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo en las siguientes generaciones. De esta manera, se disponen como fragmentos cromosómicos acéntricos que se rodean de membrana nuclear y llegan a aparecer en el citoplasma como pequeños núcleos visibles al microscopio óptico (Matheus y Bolaños, 2014). En la Fig. 2 se muestra con más detalle el proceso de formación de los micronúcleos.

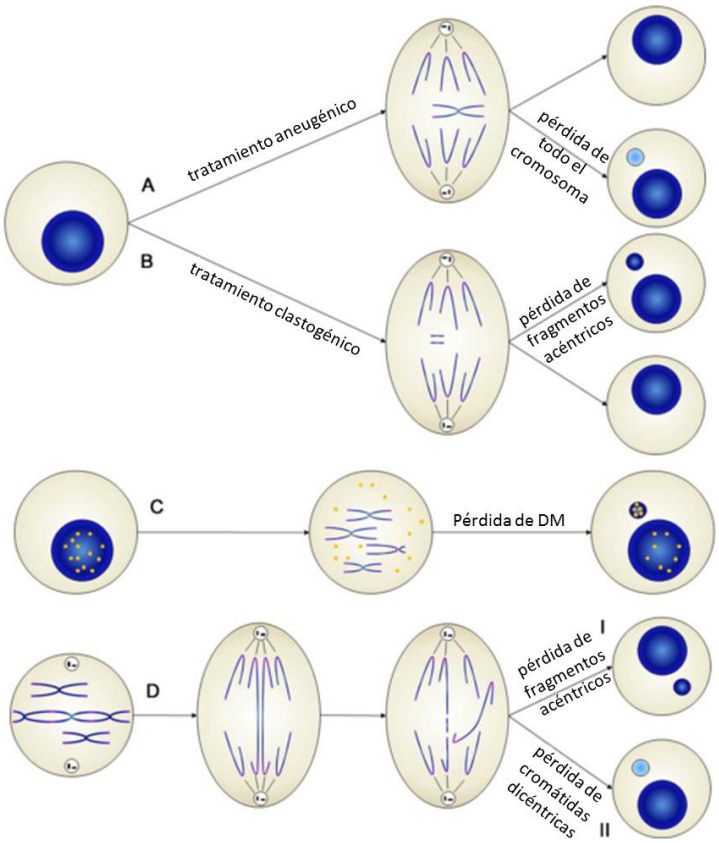


Figura 2. Mecanismo de formación de los micronúcleos. (A) Bajo tratamiento aneugénico. (B) Bajo tratamiento clastogénico. (C) Presencia de *extrachromosomal double minutes* (DM)(los puntos amarillos indican la presencia de un DM). (D) Formación a partir de perturbaciones mitóticas del tipo *breage-fusion-bridge* (BFB) –I– Torsión entre dos centrómeros de un cromosoma dicéntrico. – II– Separación de los centrómeros en los cromosomas involucrados en puentes de anafase. Fuente: (Terradas *et al.*, 2010)

El daño producido puede ser debido a dos efectos principales que se manifiestan durante una división celular errónea, lo que incide en el tamaño y presencia de estructuras que caracterizan los micronúcleos. El efecto aneuploidógeno se produce cuando los cromosomas completos quedan rezagados por un daño en el uso mitótico que se interpreta como pérdida de dichos cromosomas, mientras que el efecto clastogénico solo se evidencia en pequeños fragmentos cromosómicos que no van a presentar centrómero. En ambos casos se impide la inclusión de los mismos al núcleo de las células hijas resultantes (Torres *et al.*, 2013).

Los micronúcleos son morfológicamente idénticos pero más pequeños que el núcleo principal. Algunas de las características que se pueden utilizar para identificarlos son relacionadas por (Fenech *et al.*, 2003) y se describen a continuación:

- El diámetro de los de los micronúcleos en los linfocitos humanos varían normalmente entre 1/16 y 1/3 del diámetro promedio de núcleo principal.
- Tienen forma redondeada u ovalada
- Son no refráctales y por tanto se pueden distinguir fácilmente de otros elementos como partículas de tinción.
- No están conectados o enlazados al núcleo principal
- Pueden tocar pero no sobrepasar el núcleo principal y el borde micronuclear debe estar bien delimitado del borde nuclear.

Usualmente tienen la misma intensidad de tinción que la del núcleo principal pero algunas veces puede ser más intensa.

2.5.2. Agentes micronucleogénicos. Mecanismos de acción

Los agentes micronucleogénicos se clasifican en dos tipos con base en su mecanismo de acción; aneugénicos y clastogénicos (Martínez, 2009). Los agentes aneugénicos son agentes químicos que incrementan la formación de cromosomas dentro de la célula. Esto es logrado por medio de una segregación desigual de cromosomas durante división celular, resultando en una célula hija con más cromosomas que lo normal y otra con menos. El modo de acción de estos compuestos es generalmente a través de la interrupción de la formación del huso mitótico que causa un número desigual del número de cromosomas en cada célula hija resultante (Plant, 2003). Aquellos cromosomas que no son

incorporados al núcleo durante la anafase pueden ser rodeados por la envoltura nuclear y formar un micronúcleo (Fig. 2A). El ADN contenido en el micronúcleo podría equilibrar el ADN nuclear y resultar en un genoma completo o ser adicional al genoma celular.

Los compuestos que causan aneuploidías (agentes aneugénicos) no necesariamente interfieren en el ADN, sino que ejercen su efecto alterando la segregación de ADN durante la meiosis. Al contrario de esto, los agentes clastogénicos son agentes físicos o químicos capaces de inducir roturas cromosómicas, provocando roturas en las hebras y desplazamientos de estas. Los fragmentos acéntricos resultantes de estas roturas son incapaces de adherirse a las fibras del huso y de integrarse en el núcleo de la célula hija, formando fácilmente estructuras micronucleicas (Fig. 2B)(Terradas *et al.*, 2010).

No obstante, pueden existir otras fuentes de formación de los micronúcleos. Algunos tratamientos, tales como la incubación con hydroxyurea o exposición radioactiva, pueden inducir *double minutes* (DMs), fragmentos circulares pequeños que carecen de telómeros y centrómeros activos y que fácilmente puede formarse alrededor de ellos un micronúcleos (Fig. 2C).

2.5.3. Utilidad del Ensayo de Micronúcleos como medida de inestabilidad genética

Varios estudios se han enfocado en la investigación de drogas citostáticas utilizadas en los protocolos antitumorales contra el cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citostáticos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer debido a que pueden inducir daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. El resultado de estos trabajos demostró que los complejos químicos utilizados incrementan de modo significativo el número de micronúcleos (Zalacain *et al.*, 2005).

En otros estudios se ha demostrado que trabajadores de hospitales o de fábricas que están expuestos a agentes tóxicos, presentan una mayor frecuencia de micronúcleos (Maffei *et al.*, 2002, Carranza, 2011, Franco de Diana *et al.*, 2012). El Ensayo de Micronúcleos también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de micronúcleos (Arribas, 2002, Martínez y Gómez, 2007).

En la mayoría de los reportes del efecto del tabaco en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos, los resultados indican que los fumadores tienen baja frecuencia de micronúcleos. En muchos

de ellos la frecuencia de micronúcleos no está influenciada por el número de cigarros fumados por día entre los sujetos que trabajan bajo exposición de agentes genotóxicos. Sin embargo, la frecuencia de micronúcleos se puede incrementar significativamente en aquellos fumadores con más años de consumo en condiciones similares (Bonassi *et al.*, 2003).

La contaminación de los ecosistemas acuáticos puede provocar la pérdida de biodiversidad y abundancia de las especies. Al igual que se ha evaluado el nivel de daño genético en humanos, de igual forma pueden realizar estudios similares encaminados a valorar la calidad ambiental de estos ecosistemas. La aplicación del Ensayo de Micronúcleos en especies de peces de diferentes estuarios sometidos a varios niveles de contaminación, ha permitido determinar el alcance de la contaminación provocada y los bioindicadores más susceptibles a las sustancias químicas presentes en el medio (Alarcón *et al.*, 2007, Corredor *et al.*, 2012, Gutiérrez, 2013).

Otra utilidad práctica que se le da al Ensayo de los Micronúcleos es en el estudio de extractos naturales para evaluar su capacidad genotóxica en su administración como medicamento en el organismo humano. Por ejemplo, los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y carcinogénicas y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones (Montero *et al.*, 2001). Por otro lado, la presencia mayoritaria de ácidos grasos polinsaturados y de compuestos fenólicos en el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet le han conferido un potente efecto antioxidante y se destaca por su actividad antialérgica y su capacidad como protector solar. A pesar de que existen evidencias que demuestran que este extracto influye en el desarrollo del sistema nervioso central (Costa *et al.*, 2006), se determinó que no es mutagénico ni genotóxico según el Ensayo de Micronúcleos (Narciandi, 2014).

2.6. Mecanismo de acción de los mutágenos más utilizados en ensayos de genotoxicidad *in vivo*

Es importante conocer las sustancias químicas que causan daño al ADN para evitar su incorporación al organismo y utilizarlos como controles positivos en las baterías de ensayos genotóxicos.

Un ejemplo de ello lo constituye la Bleomicina. Según la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos[2], la Bleomicina detiene o desacelera el crecimiento de células cancerígenas en el cuerpo y

[2] URL: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster/a682125-es.html

puede usarse además para combatir el sarcoma de Kaposi, relacionado con el virus del SIDA. El mecanismo de acción antitumoral de la bleomicina consiste en fragmentar las cadenas de ADN, dependiendo de la interacción de las moléculas de O_2 del antibiótico con iones ferrosos o cúpricos. Cuando la bleomicina se intercala entre las cadenas del ADN y en presencia del alto contenido de O_2 que tiene en su molécula y de agentes reductores, se activa por la citocromo P-450 ejerciendo acciones enzimáticas oxidativas mediante la producción de radicales libres o peróxidos que poseen una potente actividad destructora del ADN (Arencibia, 2014).

Otro mutágeno muy utilizado es la Mitomicina C, que es un producto natural derivado de *Streptomyces caespitosus*. Se administra por vía intravenosa para tratar varios tipos de cáncer, tales como carcinoma esofágico, cáncer anal, cáncer de mama e instilaciones del cáncer de vejiga. Contiene grupos aziridina, quinona y uretano. Actúa como un agente alquilante polifuncional, reacciona con el ADN formando enlaces intercatenarios e intracatenarios con dicha molécula (fundamentalmente con guanina y citosina). Inhibe la síntesis del ARN y ADN mediante la liberación de radicales libres tipo hidroquinona y semiquinona, degrada el ADN preformado y causa lisis nuclear y formación de células gigantes (García *et al.*, 2001).

2.6.1. Mecanismo mutagénico de la Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida (CF), también conocida por sus nombres comerciales Citoxan, Neosar, Genuxal o Citofosfana es un agente del grupo de oxazoforinas que pertenece al grupo de los alquilantes de base. Su uso como control positivo ha sido ampliamente evaluado en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad (Arencibia *et al.*, 2011a, Abdella, 2012). El principal uso de la ciclofosfamida junto a otros agentes de quimioterapia es en el tratamiento de linfomas, algunos tipos de leucemia, tumores, como también para tratar enfermedades auto-inmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico, Granulomatosis de Wegener y Esclerosis múltiple.

Se conoce que este mutágeno no tiene especificidad por alguna fase del ciclo en particular, actúa sobre cualquiera de ellas con excepción de la G_0. Estos agentes poseen grupos químicos en su estructura que tienen la propiedad de unirse en forma covalente con elementos nucleofílicos de las células, reemplazando un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en la molécula del ADN. Generalmente esto ocurre en el nitrógeno siete de la guanina.

La mayoría de los agentes alquilantes como la CF se consideran bifuncionales debido a que poseen dos radicales activos que reaccionan con grupos intracadena formando puentes con el filamento molecular helicoidal que determinan la muerte celular. La actividad de la CF es máxima durante la replicación celular, cuando parte del ADN no está apareado y es más susceptible a la alquilación. Es por ello que la CF es más dañina al ADN durante la fase de división celular, pues es cuando los cromosomas de la célula están más expuestos a la acción de agentes externos, por lo cual se analizan las células en metafase debido a que estas confluyen entre sí (Arencibia, 2014).

2.7. Descripción y caracterización del género *Agave*

El género *Agave* proviene del griego: αγαυή, que significa "noble" o "admirable". A él pertenecen plantas suculentas que forman una extensa familia botánica que durante un período de tiempo relativamente largo llevaba el mismo nombre: *Agavaceae* (sistema de clasificación nomenclatural para plantas con flores: Cronquist). Sin embargo, actualmente debido a los cambios relacionados con el sistema de clasificación taxonómico de las angiospermas según criterios filogenéticos (APG III), se ha ubicado a este género dentro de la familia *Asparagaceae*; conocido con los nombres comunes de agave, pita, maguey, cabuya, fique o mezcal.

Las plantas pertenecientes a este género son muy grandes y forman una roseta de hojas muy gruesas y carnosas que generalmente terminan en una aguja recta o curva, bien afilada en su ápice. Presentan además un tallo robusto y leñoso que puede ser muy corto, por lo que en ocasiones las hojas aparentan surgir de la raíz. Exhiben flores dispuestas como una inflorescencia en forma de espiga o panoja en un escapo largo, con un perianto de seis partes que presenta una morfología aproximadamente embudada. Contiene seis estambres que comúnmente, son muy exertos, un ovario trilocular y un estigma trilobulado dispuesto finalmente. Evidencia una cápsula con semillas numerosas, negras y aplanadas, en dos series por cada celada. La reproducción de este género se puede dar por las propias semillas o bulbillos, o bien eficientemente por rizomas. La edad óptima de su reproducción oscila entre los tres y cinco años. Además, se debe considerar que su crecimiento es muy lento ya que requiere de un clima semiseco con temperaturas promedio de 22°C, bajo condiciones de suelo arcilloso, permeable y abundante en elementos que deriven del basalto y con presencia de hierro con preferencia volcánica. Es de gran importancia su exposición al sol y la maduración de la planta va desde 8 a 10 años pues florecen una vez y emiten un largo tallo que alcanza casi los 10 metros de altura (ramificado o no) que nace del centro de la roseta, con numerosos grupos de flores tubulares y muere tras desarrollar el fruto,

pero generalmente desarrolla retornos en su base para evitar la pérdida de sus especies (Hermano y Hermano, 1946).

Muchas son las especies de este gran género que se encuentran distribuidas en determinados lugares del continente americano, de donde es nativa. Se han logrado clasificar más de 250 especies que en su mayoría forman parte de la flora mexicana. En Cuba, fundamentalmente se han centrado las clasificaciones en 18 especies con una gran importancia farmacéutica y en otras esferas; una de las cuales lo constituye *Agave brittoniana* que fue descrita por Trelease en 1913 y que por encontrarse entre una de las plantas endémicas de la región central de nuestro país, requiere de interés su estudio tanto fitoquímico como farmacognóstico (Acevedo y Strong, 2012).

2.8. Antecedentes en el estudio químico y farmacognóstico del género *Agave*

La búsqueda de los productos naturales se realiza mediante investigaciones fitoquímicas, que se basan en la determinación cuantitativa y el aislamiento de metabolitos. Posteriormente el análisis de su actividad biológica conduce a obtener posibles aplicaciones.

El género *Agave* se ha caracterizado por presentar metabolitos secundarios con una capacidad activa ante numerosos procesos infecciosos que atacan a la especie humana, incluso en la producción de ciertos alimentos y productos de interés económico. Las plantas tienen múltiples empleos: se utilizan sus hojas, ricas en fibras longitudinales que constituyen su sistema vascular, para producir cáñamo, cuerdas, redes, etc. Posee grandes cantidades de inulina, la cual se hidroliza parcialmente en fructuosa y un componente que no se puede degradar y de depuración urinaria, motivo por el cual se utiliza en la medicina para evaluar la función renal.

La savia del género *Agave*, por sus atributos medicinales estudiados, tiene propiedades antisépticas, es estimulante del crecimiento de la microbiota intestinal, mejora la eliminación de toxinas en el cuerpo y se recomienda para tratar la tuberculosis pulmonar, enfermedades hepáticas y la ictericia. Las hojas secas de las plantas de este género son utilizadas por sus propiedades digestivas y hepáticas. Externamente es utilizado para la irritación ocular y el jugo fresco de la hoja se usa para tratar heridas e irritaciones de la piel. Además, inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos (Inkanatural, 2015).

Las saponinas se han reconocido por su capacidad de contribuir a la antiobesidad dado su fuerte actividad hipolipemiante e hipoglucemiante (Giner Larza y Castillo García, 2003, López, 2006,

Villasana, 2008). Las saponinas esteroidales aisladas de la especie *Agave* son glicósidos con varias unidades de monosacáridos que se unen mediante enlace glicosídico, a un resto denominado aglicón o sapogenina. Son fundamentalmente espirostanos y furostanos; los que son de gran utilidad ya que, en el primer caso son utilizadas en la síntesis de hormonas esteroidales (Diosgenina) debido a su semejanza estructural con los esteroides animales y por su actividad citotóxica frente a las células HeLa y HL-60, su actividad diurética y actividad molusquicida. En el caso de los furostanos, se destaca su actividad antiinflamatoria, molusquicida e inhibir la permeabilidad capilar (Guerra, 2005).

En el *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* se han aislado y caracterizado los diferentes metabolitos presentes en los órganos de la planta (hojas, flores y raíces), siendo las saponinas (identificadas 19 según la bibliografía *in situ*, de las cuales 11 se reportan por primera vez en la literatura) y los azúcares reductores los que en mayor concentración se pueden encontrar (Tabla II)(Guerra, 2005). En el primer caso, las mayores concentraciones son observadas cuando las hojas de la planta están secas razón por la cual se decide tomar como material de preparación del extracto a evaluar en nuestra investigación. En otros estudios realizados se ha llegado a analizar la actividad farmacológica de las saponinas aisladas, demostrándose sus propiedades antiinflamatorias y su efecto bifásico en la bomba ($Na^+ + K^+$)-ATPasa donde le confiere algunas propiedades diuréticas (Silva *et al.*, 2005, da Silva y Parente, 2007).

Tabla II. Resultados de la determinación cualitativa de metabolitos secundarios en *Agave brittoniana*

T. Fuente: (Guerra, 2005)

Metabolito	Ensayo	Hojas	Raíces	Flores
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+
	Mayer	+	-	+
	Wagner	+	-	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann- Burchard	+	+	+
Quinonas	Borntrager	-	-	-
Cumarinas	Baljat	-	-	-
Aceites esenciales y grasas	Sudan III	+	-	+
Azúcares reductores	Fehling	+++	+	+++
Saponinas	***Espuma***	**+++**	**+**	**+++**
Fenoles y taninos	Cloruro de hierro (III)	-	+	-
Aminoácidos y aminas	Nihidrina	+	-	+
Glicósidos	Molish	+	+	+
Flavonoides	Shimoda	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Kedde - Raymond	-	-	-

Esta especie de *Agave* tiene propiedades antiparasitarias que fueron confirmadas al evaluar extractos hidroalcohólicos de sus hojas frente a *Fasciola hepatica*, *Trypanosoma cruzy* y *Trichomona vaginalis*. Además, se determinó mediante una técnica de susceptibilidad microbiana *in vitro* la inhibición del crecimiento de micelios de tres cepas de hongos; *Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii* y *Phytophtora parasitica* var. *nicotianae* a lo que se le atribuyó una fuerte actividad antifúngica (Guerra, 2005, Guerra *et al.*, 2008).

En varios estudios se ha determinado la actividad tóxica de las saponinas (Paredes y Enrique, 2010, Thakur *et al.*, 2011, Mwale *et al.*, 2013), motivo por el que se considera relevante su estudio dentro del agave. Sin embargo, su actividad genotóxica ha sido poco estudiada y en aquellos casos en que los extractos analizados han evidenciado daño al ADN no se ha podido determinar si se debe únicamente a las saponinas, debido a que estaban acompañadas por otros metabolitos secundarios tales como flavonoides o alcaloides (Moreira *et al.*, 2013, Kalachaveedu *et al.*, 2014). Aun así, dichos estudios mostraban que las concentraciones de saponinas eran relativamente mayores que el resto de los metabolitos. En otras investigaciones se ha determinado que las saponinas no muestran un efecto genotóxico, lo cual puede estar relacionado a los tipos de estas que están presentes en los extractos evaluados o a la dosis administrada. En un estudio hecho en algunas especies pertenecientes al género *Nauclea*, las saponinas contenidas en el extracto de esta planta provocaban daño al ADN y mutaciones cromosómicas en células de mamíferos; debido, quizás, a la capacidad de estas saponinas para reducir la defensa celular contra el estrés oxidativo a través de la inhibición de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (Liu *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 3.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección, preparación y obtención del extracto butanólico de *Agave brittoniana* T.

Las hojas de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* se tomaron cuando se encontraban en estado de senescencia (secas) para no dañar otros órganos de la planta. Se recolectaron en horas de la mañana en el Centro de Estudios del Jardín Botánico (CEJB), de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, entre los meses de octubre y noviembre de 2014. Este material fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica del Departamento de Licenciatura en Química de la Facultad de Química-Farmacia y lavado con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por un experto, el Dr. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del CEJB. Ejemplares de la planta se compararon con muestras depositadas en el herbario ULV, con el número: 5445[3].

Las hojas recolectadas se cortaron en pequeños pedazos y se retiró toda la corteza de las mismas. Seguidamente se secaron mediante calor artificial (40°C) en una estufa hasta lograr la obtención de un peso constante y después se colocaron en un molino de cuchillas (KMf 10 basic .IKAR WERKE).

Para obtener el extracto hidroalcohólico se procedió a la maceración con agitación manual protegido de la luz, durante 7 días, con etanol al 70%.

El extracto resultante se evaporó a 40º C y presión de vapor reducida, hasta obtener una mezcla pastosa que contenía el crudo de metabolitos, la cual fue colocada en la estufa a 40º C hasta su secado total. Finalmente, para la obtención de los "crudos de saponinas" (extracto en n-butanol) fueron disueltos en agua 10 g del extracto hidroalcohólico, desengrasado con n-hexano y posteriormente extraído en embudo separador con n-butanol saturado en agua. La fase orgánica fue colectada y evaporada a presión reducida hasta sequedad, obteniéndose el crudo de saponinas deseado. Se preparó el extracto blando (solución de saponinas en agua destilada) en dependencia de la dosis a administrar en los animales.

[3] A. Noa, M. Camacho, R.P. Calzada. P. López, (# 5445), ULV

3.2. Aspectos éticos con el uso de animales de laboratorio

Los estudios se ejecutaron teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio en Farmacología Experimental y todas las actividades se ejecutaron según lo establecido por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO) y sujetos a las inspecciones programadas por la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) y del Centro de Toxicología Experimental (CENTOX). Además, se cumplieron las normas de Bioética y Bioseguridad relacionadas con la experimentación animal.

3.3. Animales

Se utilizaron ratones adultos jóvenes de los dos sexos (8-9 semanas) de la línea balb/c (Anexo 3) por ser la recomendada para este tipo de ensayo genotóxico (Arencibia *et al.*, 2011a), por contar en el país con una amplia base de datos fármaco-toxicológica sobre la especie y línea, así como por la experiencia con que cuenta el Centro en el trabajo con este modelo experimental. Son animales consanguíneos lo que resulta de vital importancia para la estandarización y evaluación en este tipo de técnicas.

Al término de la cuarentena, el peso corporal oscilaba entre 20 y 30 g. Todos los animales fueron suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales están previamente certificados para la investigación después de haberle realizado las pruebas de parasitología, bacteriología, virología y patología correspondientes (Anexo 1).

3.4. Condiciones de tenencia y alimentación

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas: a una temperatura de 20 ± 2 ºC, con una humedad relativa de 30 a 70%, y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. La administración de agua fue *ad libitum*. Para alimentarlos, se les suministró 5 g por animal, de pienso para ratas y ratones, todo propósito, esterilizable, que no requiere suplemento dietético: fórmula EAO1004, suministrada por el CENPALAB (Anexo 2). Este proceder se consideró homogéneo para todos los grupos de los ensayos a realizar.

3.5. Diseño experimental

Para la formación de los grupos experimentales se distribuyeron aleatoriamente 10 animales (5 de cada sexo) por cada grupo experimental, según lo establecido en (OECD, 2013).

Se conformaron cuatro grupos experimentales en dependencia de los tratamientos a administrar por cada ensayo.

Como control negativo se utilizó la sustancia vehículo del extracto que fue el agua destilada, suministrada por vía oral. El volumen descrito para la administración fue de 10 mL/Kg de peso. En estos casos se establece que los animales permanezcan sin tratamiento alguno, pero según investigaciones precedentes sobre la experimentación animal se considera el empleo de agua destilada en un grupo para evaluar el efecto que el stress mecánico puede causar a los animales por la canulación oral repetitiva.

Como control positivo se administró la ciclofosfamida (Lote: PCYDKB401) por vía intraperitoneal a una concentración de 50 mg/Kg de peso; evaluado ampliamente en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad (Arencibia *et al.*, 2011a, Abdella, 2012).

En estudios de toxicidad aguda realizados previamente en el centro sobre *Agave brittoniana* subsp. *brachypus*, se determinó que a dosis de 1 mg/Kg de su extracto butanólico liofilizado no mostró evidencias de toxicidad al realizar un estudio anatomopatológico macro y microscópico de los órganos (estómago, corazón, hígado, bazo, riñones, pulmones) cuando se sacrificaron los animales. Este criterio contribuyó a la selección de las dosis a evaluar en genotoxicidad durante la presente investigación. De esta forma, se estableció la dosis de 1 mg/Kg como la dosis farmacológica de seguridad y se aumentó con el objetivo de establecer una dosis baja (ya descrita) y una media con valor de 5 mg/Kg. Ambas grupos se administraron por canulación (entubación gástrica).

3.6. Clínica

Se realizaron dos observaciones diarias: en el horario de la mañana, comprendido entre las 8:30 y las 10:30 horas y en la tarde, entre las 15:00 y 16:00 horas. En cada observación se tuvo en cuenta el estado general del animal después de la administración. Este procedimiento se basó en la palpación y la detección de lesiones, así como las posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, sistema cardiovascular, gastrointestinal, el estado de la piel, el pelo, la coloración de las mucosas y de los ojos según recomendaciones en estudios anteriores (Shayne, 2007, Arencibia *et al.*, 2010).

3.7. Medición del peso corporal

Los animales fueron pesados al comienzo y fin del período de adaptación registrando los pesos en aras de seleccionar aquellos que participarían en el estudio. En el momento de la inoculación inicial (Fecha de Inicio experimental) se pesaron los animales para definir el peso real de los mismos al comienzo del estudio. Así mismo, se realizaron pesajes a todos los animales a intervalos semanales (1, 7 y 14 días) registrándose de forma individual por grupo, sexo y tratamiento (Shayne, 2007). A pesar de que la medición del peso corporal no se incluyó en los objetivos específicos, constituye una variable imprescindible para evaluar en los estudios toxicológicos sistémicos, resultado este que puede ser corroborado o no por una genotoxicidad del extracto a evaluar.

3.8. Técnicas citogenéticas realizadas

3.8.1. Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea de ratón

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 2 ml de suero bovino fetal (OECD, 1997, Arencibia *et al.*, 2013). La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas"(Hayashi *et al.*, 1994). Se contabilizó la presencia de EPC y ENC en 2 000 células/animal, con ayuda de un microscopio óptico BH-2. Además, se calculó la frecuencia de EPC portadores de micronúcleos (MN-EPC) en 2 000 EPC/animal, según los requisitos establecidos. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EPC/EN de la población total de eritrocitos (Saínz, 2001, Alvis, 2010, Arencibia *et al.*, 2011a).

3.8.2. Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica de ratón

La muestra de sangre se tomó a los 48h pos tratamiento, obteniéndose por tijereteado de la cola. Se tomaron 5 μl, se colocaron sobre una lámina preparada con Naranja de Acridina y se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 40mm. Se montaron dos láminas por animal, se codificaron y el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones se realizaron "a ciegas" (Carranza,

2011). Se contaron sobre la base de 1 000 reticulocitos por láminas (2 000 x animal), registrando los reticulocitos con micronúcleos (MNRETs). La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con la combinación de un filtro azul excitador de 480 nm y un filtro barrera amarillo-naranja 515 nm. Se evaluó con un aumento total de 400x (Saínz, 2001).

Para cubrir las láminas se preparó una solución de Naranja de Acridina a una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 µl de la solución y se extendieron con ayuda de una varilla de cristal sobre la lámina previamente calentada a 70°C. Las láminas se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en un lugar seco. Luego se procesaron los resultados en dependencia de la cantidad de micronúcleos maduros e inmaduros presentes, tomándose los primeros como un índice de referencia para indicar genotoxicidad en la muestra (Alvis, 2010).

3.9. Eutanasia

La eutanasia se realizó por dislocación cervical, con previa atmósfera de éter, según establece la Unión Europea y el Consejo Canadiense del Cuidado de Animales (Baumans *et al*., 1997, CCAC, 2010).

3.10. Análisis estadístico

En las variables continuas peso corporal, frecuencia de EPC portadores de micronúcleos e índice de citotoxicidad (EPC/ENC), se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza (ANOVA), el cual pudo ser aplicado a los resultados que estuvieron distribuidos normalmente (normalidad, según la prueba de Shapiro-Wilks), existía dependencia entre las observaciones y presentaron homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Se estableció el nivel de significación de $\alpha = 0{,}05$. Para identificar entre qué grupos existían diferencias significativas, se utilizó el Test de Bonferroni en los datos que mostraban homogeneidad de varianzas y el Test de T2 de Tamhane para aquellos que no (Kirkland, 1994).

En el caso de que no se cumpliera la normalidad de los datos, se aplicó el test no paramétrico Kruskal Wallis de *k* muestras independientes para determinar si existían diferencias ($\alpha = 0{,}01$) y el test de Mann-Whitney ($\alpha = 0{,}0017$ dada la corrección de Bonferroni α/k para una significación del 99%) para determinar entre qué grupos existían las diferencias (Kirkland, 1994).

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el SPSS v15.0.

CAPÍTULO 4.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Durante la inspección clínica diaria a los animales no se encontraron síntomas de afecciones respiratorias, del sistema nervioso, del sistema cardiovascular y del gastrointestinal. No se detectaron en ninguno de los dos grupos de administración de Agave lesiones en la piel, cambios de coloración en las mucosas y ojos, ni piloerección. Aun así, un animal murió pero se considera que no fue causa de la dosis del extracto administrado a 1 mg/Kg, si no al daño físico producido por el proceso de canulación.

4.1. Evaluación del peso corporal de los ratones balb/c en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea y Sangre Periférica

Los resultados obtenidos en la evaluación del peso, de los ratones involucrados en el ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea y en Sangre Periférica, se muestran en la Tabla III y Tabla IV respectivamente.

Tabla III. Comportamiento del peso corporal (g) en ratones balb/c de ambos sexos durante el Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea ($\bar{X}$ ± DE).

Grupos	Sexo	Día 1		Día 7		Día 14	
Control negativo	♀a	21,8 ± 1,17	21,8 ± 0,84	21,2 ± 0,94	21,8 ± 1,49	21,1 ± 0,65	21,9 ± 1,28
	♂b	21,7 ± 0,47		22,5 ± 1,72		22,8 ± 1,21	
Extracto de Agave 1mg/Kg	♀a	21,0 ± 0,92	21,5 ± 1,29	20,7 ± 0,83	21,7 ± 1,27	20,7 ± 0,85	21,7 ± 1,58
	♂b	22,0 ± 1,48		22,7 ± 0,80		22,6 ± 1,62	
Extracto de Agave 5mg/Kg	♀a	20,9 ± 0,75	21,6 ± 1,34	21,1 ± 0,84	21,6 ± 1,08	20,4 ± 0,44	21,1 ± 1,03
	♂b	22,2 ± 1,51		22,0 ± 1,14		21,7 ± 1,1	
Control positivo (CF)[i]	♀a	21,6 ± 0,8	21,5 ± 0,74	20,7 ± 1,0	21,7 ± 1,50**	19,3 ± 0,8	20,3 ± 1,25***
	♂b	21,3 ± 0,8		22,9 ± 0,93		21,3 ± 0,73	

(♀ Hembras - ♂ Machos,

[ab]- letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA) dentro de cada grupo entre los sexos según el peso corporal medido en los 14 días de experimentación,

* diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA); entre el grupo de control positivo y los días de medición del peso corporal,

CF (Ciclofosfamida)[i], administración intraperitoneal)

Tabla IV. Comportamiento del peso corporal (g) en ratones balb/c de ambos sexos durante el Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica ($\bar{X}$ ± DE).

Grupos	Sexo	Día 1		Día 7		Día 14	
Control negativo	♀	20,5 ± 0,64	22,1 ± 1,83	22,8 ± 1,66	22,2 ± 1,36	22,9 ± 0,98	22,3 ± 1,17
	♂	23,6 ± 1,02		21,6 ± 0,75		21,6 ± 1,02	
Extracto de Agave 1mg/Kg	♀a	20,6 ± 0,40	21,6 ± 1,18	21,3 ± 0,77	21,9 ± 0,86	21,2 ± 0,67	21,7 ± 1,23
	♂b	22,5 ± 0,8		22,4 ± 0,65		22,4 ± 1,54	
Extracto de Agave 5mg/Kg	♀a	21,5 ± 0,9	21,6 ± 0,73	20,7 ± 0,86	21,8 ± 1,41	20,6 ± 0,7	21,5 ± 1,14
	♂b	21,8 ± 0,6		22,9 ± 0,83		22,4 ± 0,56	
Control positivo (CF)[i]	♀a	21,1 ± 0,99	21,6 ± 1,09**	22,4 ± 0,64	21,9 ± 0,81**	21,2 ± 1,14	20,3 ± 1,25***
	♂b	22,0 ± 1,09		21,4 ± 0,65		19,5 ± 0,55	

(♀ Hembras - ♂ Machos,

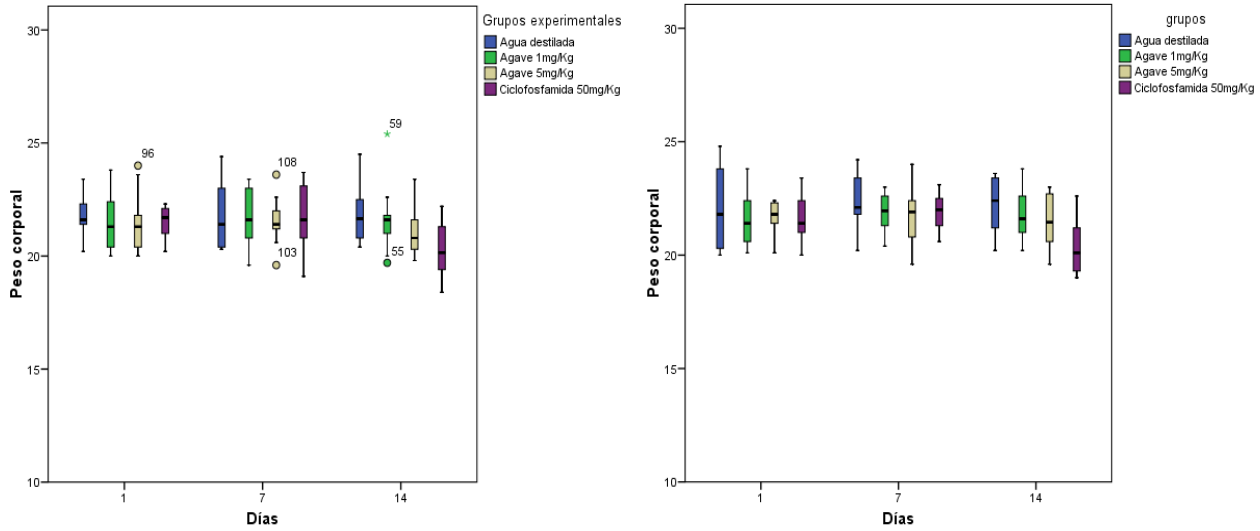
[ab]- letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA) dentro de cada grupo entre los sexos según el peso corporal medido en los 14 días de experimentación,

* diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA); entre el grupo de control positivo y los días de medición del peso corporal,

CF (Ciclofosfamida)[i], administración intraperitoneal)

Del análisis estadístico realizado se comprobó que el peso corporal de los ratones en los dos experimentos, atendiendo a cada uno de los grupos de experimentación, no mostraba diferencias significativas para un nivel de significancia del 95%.

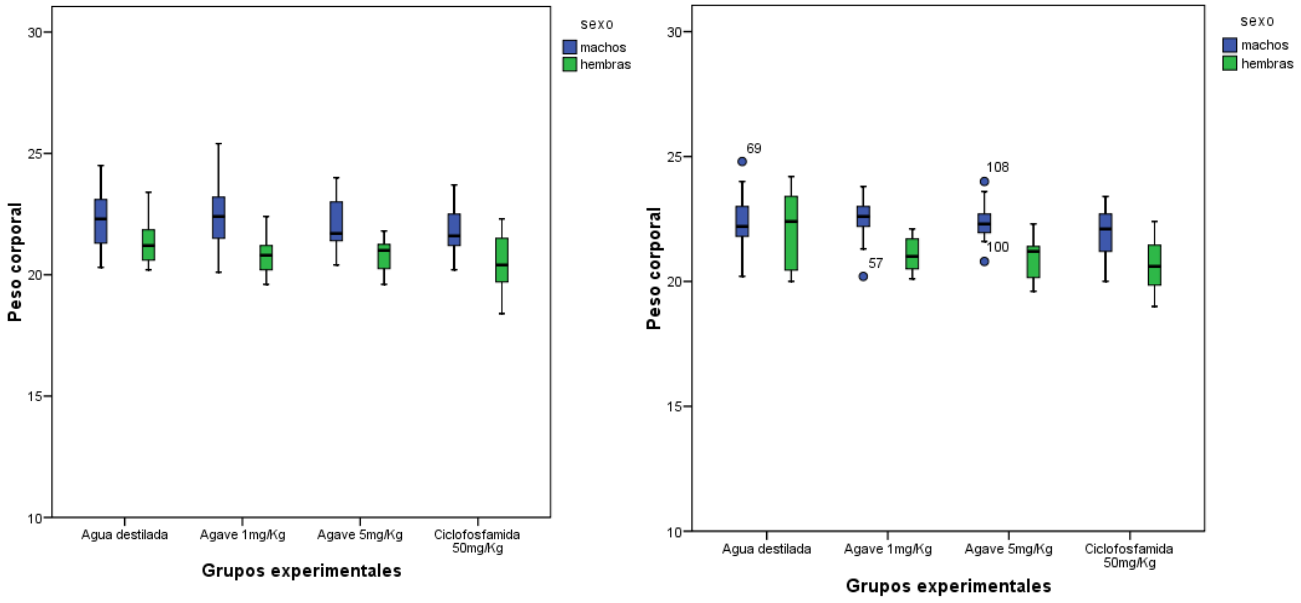
A su vez, los pesos evaluados en los tres momentos de medición definidos en el capítulo anterior para el Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea, se comportaron de forma homogénea en cada uno de los grupos de experimentación, excepto en el grupo de control positivo que mostró diferencias significativas. En el Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica se observó un comportamiento similar ya que solo hubo diferencias significativas en el grupo donde se administró Ciclofosfamida. Las diferencias de pesos estuvieron dadas entre los pesos medidos a los 14 días de iniciada la experimentación y los medidos al inicio y a los 7 días (Fig. 3).



(a) (b)

Figura 3. Efecto de la administración de la Ciclofosfamida en la medición del peso corporal (g) a los 1, 7 y 14 días de iniciada la experimentación. (a) Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea. (b) Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica.

En el caso del Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea, hubo diferencias en los pesos dentro de cada grupo según el sexo de los ratones (Fig. 4a). En el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica, solo fueron observadas diferencias en el peso con respecto al sexo en el grupo de administración de Agave a 1 mg/Kg y el grupo de administración de Agave a 5 mg/kg (Fig. 4b).



(a) (b)

Figura 4. Peso corporal (g) según el sexo dentro de los cuatro grupos experimentales en (a) el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea y (b) el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica

4.2. Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea

Se obtuvo una tinción diferencial donde los EPC se teñían de lila claro por su contenido en ARN ribosomal y los ENC con coloración beige-naranja-gris. Los MN fueron observados fuertemente teñidos con una coloración igual a la de los núcleos principales pero con un contorno preciso y en su mayoría redondos (Fig. 5).

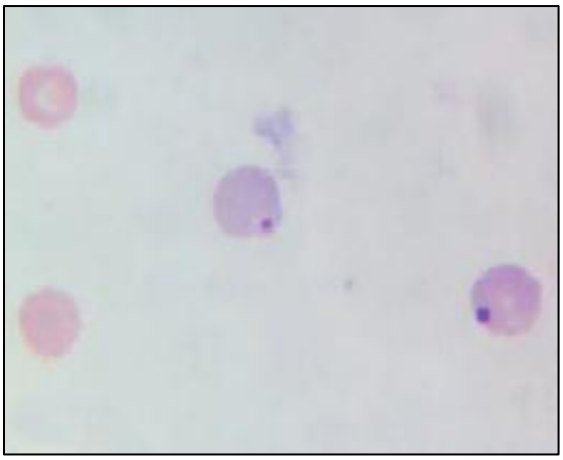


Figura 5. Eritrocitos observados en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea teñidos en Giemsa al 5%.

Para obtener el índice de citotoxicidad medular se utilizó la relación EPC/ENC. Los resultados obtenidos para ambos sexos se muestran en la Tabla V (Fig. 6) y se evidencian diferencias significativas entre los cuatro grupos de experimentación.

Tabla V. Efecto del extracto butanólico de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* en el número total de eritrocitos poli y normocromáticos y el índice de citotoxicidad en médula ósea de ratones balb/c de ambos sexos ($\bar{X}$ ± DE).

Grupos	Sexo	EPC		ENC		EPC/ENC	
Control negativo	♀b	383,5 ± 19,7	381,25 ± 18,18	116,5 ± 19,7	115,65 ± 18,88	3,38 ± 0,72	3,39 ± 0,67*
	♂a	379,0 ± 18,5		114,8 ± 20,3		3,40 ± 0,71	
Extracto de Agave 1mg/Kg	♀bb	279,6 ± 5,8	281,50 ± 4,74	220,4 ± 5,8	218,50 ± 4,74	1,46 ± 0,05	1,47 ± 0,05**
	♂aa	283,4 ± 2,9		216,6 ± 2,9		1,48 ± 0,04	
Extracto de Agave 5mg/Kg	♀bb	272,4 ± 9,6	275,10 ± 7,95	227,6 ± 9,6	224,90 ± 7,95	1,18 ± 0,08	1,18 ± 0,08***
	♂aa	277,8 ± 5,7		222,2 ± 5,7		1,18 ± 0,08	
Control positivo (CF)[i]	♀bbb	169,1 ± 41,3	177,10 ± 41,32	331,0 ± 41,5	323,45 ± 40,93	0,54 ± 0,17	0,57 ± 0,19****
	♂aaa	185,1 ± 44,5		315,9 ± 43,6		0,6 ± 0,22	

(♀ Hembras - ♂ Machos,

* diferencias significativas (p<0,0017 dada la corrección de Bonferroni para una significación del 99%); entre los cuatro grupos de experimentación,

[a] diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA); entre el índice de citotoxicidad de los ratones machos y los cuatro grupos de experimentación,

[b] diferencias significativas (p<0,05 Test ANOVA); entre el índice de citotoxicidad de los ratones hembras y los cuatro grupos de experimentación
CF (Ciclofosfamida)[i], administración intraperitoneal)

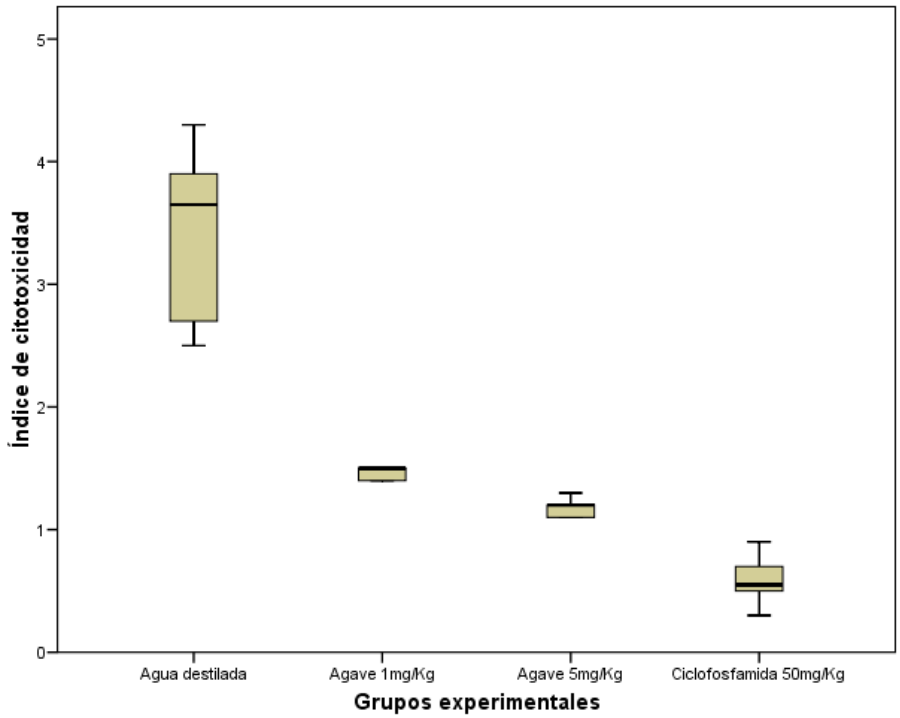


Figura 6. Índice de citotoxicidad de los cuatro grupos de experimentación para el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea.

El comportamiento observado en el índice de citotoxicidad entre los cuatro grupos, se mantuvo al analizar los resultados según el sexo, evidenciándose que el índice del grupo de administración del agave 5 mg/Kg era un poco inferior que la del grupo de agave a 1 mg/Kg (Fig. 7).

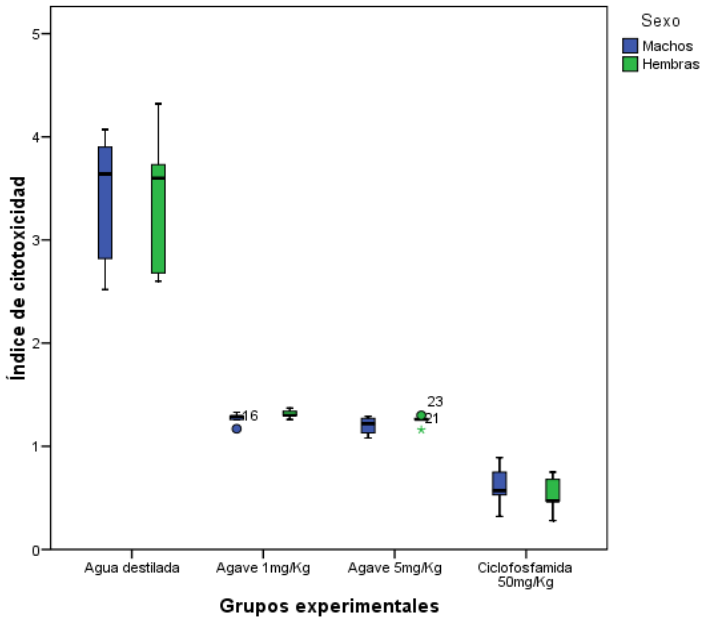


Figura 7. Índice de citotoxicidad en ambos sexos de ratones balb/c en los cuatro grupos experimentales del Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea.

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos para la frecuencia de eritrocitos con micronúcleos.

Tabla VI. Frecuencia de eritrocitos micronucleados observados en 2 000 células, en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea para ambos sexos ($\bar{X}$ ± DE).

Grupo	MN EPC/2000	%
Machos		
Control negativo	2,0 ± 0,71	0,1 ± 0,04 *
Extracto de Agave 1mg/Kg	4,8 ± 0,84	0,2 ± 0,04 **
Extracto de Agave 5mg/Kg	7,2 ± 1,3	0,4 ± 0,07 **
Control positivo (CF)[i]	27,0 ± 3,32	1,4 ± 0,17 ***
Hembras		
Control negativo	2,6 ± 1,52	0,1 ± 0,08 *
Extracto de Agave 1mg/Kg	7,0 ± 1,0	0,4 ± 0,05 **
Extracto de Agave 5mg/Kg	9,0 ± 2,0	0,5 ± 0,10 **
Control positivo (CF)[i]	27,6 ± 3,65	1,4 ± 0,18 ***
Total		
Control negativo	2,3 ± 1,16	0,1 ± 0,06*
Extracto de Agave 1mg/Kg	5,9 ± 1,45	0,3 ± 0,07**
Extracto de Agave 5mg/Kg	8,1 ± 1,85	0,4 ± 0,09**
Control positivo (CF)[i]	27,3 ± 3,3	1,4 ± 0,17***

(* diferencias significativas (p<0,0017 dada la corrección de Bonferroni para una significación del 99% o p<0,05 según la prueba estadística aplicada) entre los grupos de experimentación según el sexo y en la población general, CF (Ciclofosfamida)[i], administración intraperitoneal)

Del análisis estadístico realizado se comprobó que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los grupos de la administración del extracto de agave a 1 mg/Kg y 5 mg/Kg y los controles negativos y positivos, atendiendo a la frecuencia de eritrocitos micronucleados observados. Además, se comprobó que los resultados obtenidos en el grupo de la administración de agave a 1 mg/Kg diferían de los del grupo de la administración de agave a 5 mg/Kg, siendo en este caso superiores a los de la dosis de 1 mg/Kg (Fig. 8).

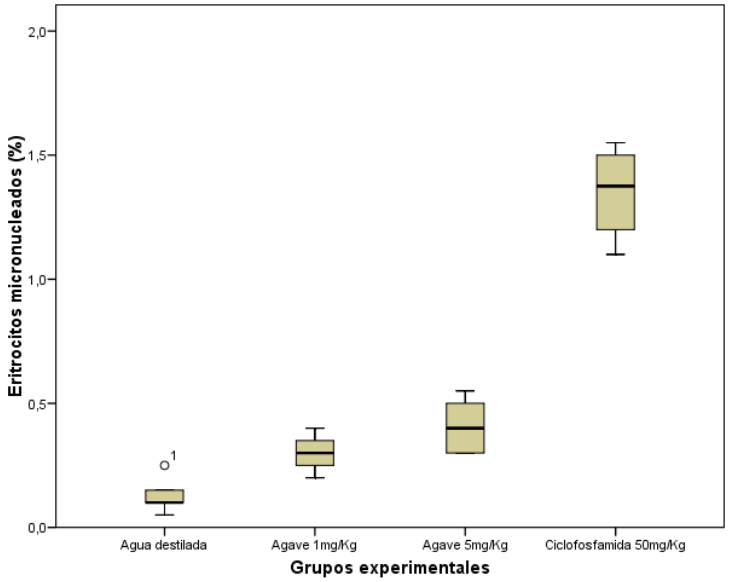


Figura 8. Porciento de eritrocitos con micronúcleos observados en 2 000 células, en los cuatro grupos de experimentación para el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea.

Al analizar el porciento de eritrocitos micronucleados según el sexo, se observó el mismo comportamiento anterior, en el que no existían diferencias entre los resultados obtenidos en los grupos de la administración del extracto de agave a 1 mg/Kg y 5 mg/Kg; pero los resultados obtenidos en estos dos grupos mostraban diferencias significativas tanto para el control negativo como para el control positivo (Fig. 9).

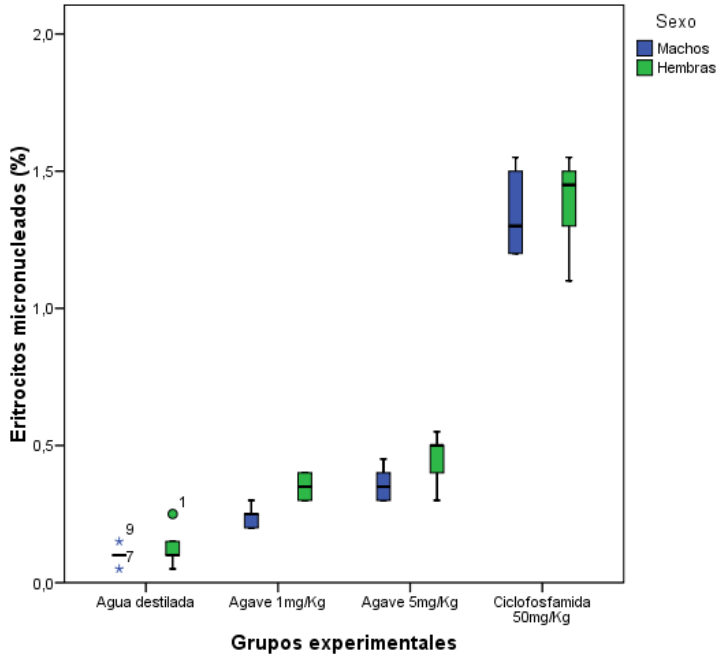


Figura 9. Porciento de eritrocitos con micronúcleos observados en 2 000 células, en los cuatro grupos de experimentación para el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea según el sexo.

4.3. Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica

Los reticulocitos en sangre periférica se pudieron observar con una fluorescencia roja debido a la presencia de ARN ribosomal en los mismos, mientras que las células nucleadas normales mostraron una fluorescencia parda oscura. Además, los MN se vieron con una coloración fluorescente verde-amarilla (Fig. 10).

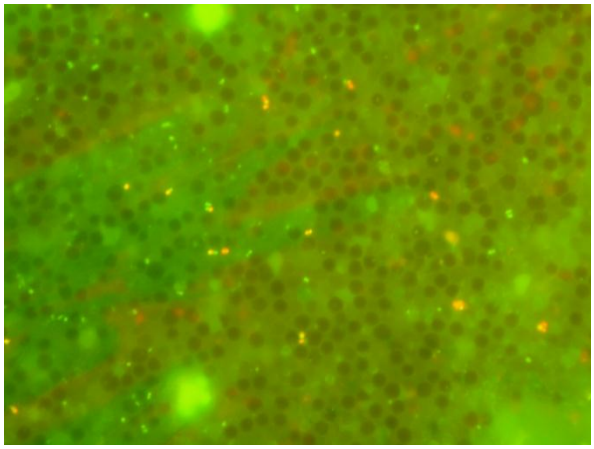


Figura 10. Reticulocitos observados en el Ensayo de Micronúcleos de Sangre Periférica teñidos en Naranja de Acridina.

En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos para la frecuencia de reticulocitos con micronúcleos.

Tabla VII. Frecuencia de reticulocitos micronucleados observados en 2 000 células a las 48 horas post tratamiento, en el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica en ambos sexos ($\bar{X}$ ± DE).

Grupo	RETsMn 2000Ret	%
Machos		
Control negativo	3,6 ± 1,52	0,2 ± 0,08 *
Extracto de Agave 1mg/Kg	8,5 ± 1,92	0,4 ± 0,1**
Extracto de Agave 5mg/Kg	9,0 ± 2,12	0,5 ± 0,11**
Control positivo (CF)[i]	68,4 ± 10,95	3,4 ± 0,55 ***
Hembras		
Control negativo	2,6 ± 1,34	0.1 ± 0,07 *
Extracto de Agave 1mg/Kg	8,8 ± 2,17	0,4 ± 0,11**
Extracto de Agave 5mg/Kg	9,8 ± 3,27	0,5 ± 0,16 **
Control positivo (CF)[i]	70,4 ± 13,72	3,5 ± 0,69 ***
Total		
Control negativo	3,1 ± 1,45	0,2 ± 0,07 *
Extracto de Agave 1mg/Kg	8,7 ± 1,94	0,4 ± 0,1 **
Extracto de Agave 5mg/Kg	9,4 ± 2,63	0,5 ± 0,13 **
Control positivo (CF)[i]	69,4 ± 11,75	3,5 ± 0,59 ***

(* diferencias significativas ($p<0,0017$ dada la corrección de Bonferroni para una significación del 99% o $p<0,05$ según la prueba estadística aplicada) entre los grupos de experimentación según el sexo y en la población general, CF (Ciclofosfamida)[i], administración intraperitoneal)

Del análisis estadístico realizado se comprobó que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los grupos de la administración del extracto de agave a 1 mg/Kg con los grupos de control y los obtenidos en el grupo de administración de agave a 5 mg/Kg y los grupos de control. Además, se comprobó que los resultados obtenidos en el grupo de la administración de agave a 1 mg/Kg no difieren de los del grupo de la administración de agave a 5 mg/Kg (Fig. 11).

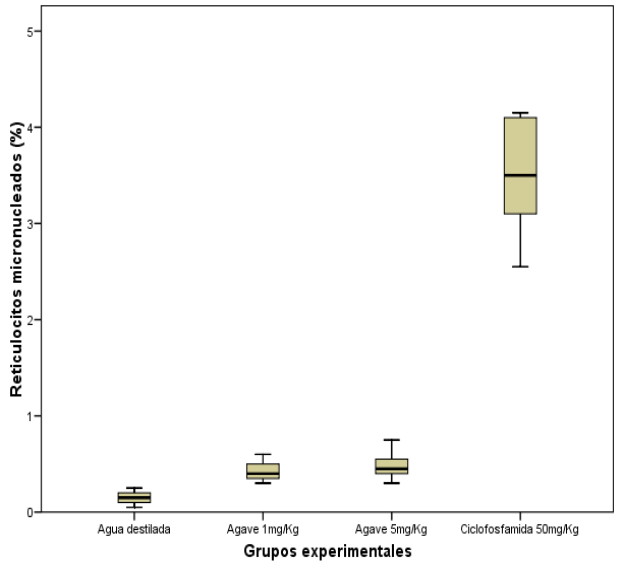


Figura 11. Porciento de reticulocitos con micronúcleos observados en 2 000 células a las 48 horas post tratamiento, en los cuatro grupos de experimentación para el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica.

Al analizar el porciento de reticulocitos micronucleados según el sexo, se observó el mismo comportamiento anterior, en el que no existían diferencias entre los resultados obtenidos en los grupos de la administración del extracto de agave a 1 mg/Kg y 5 mg/Kg; pero los resultados obtenidos en estos dos grupos mostraban diferencias significativas tanto para el control negativo como para el control positivo (Fig. 12).

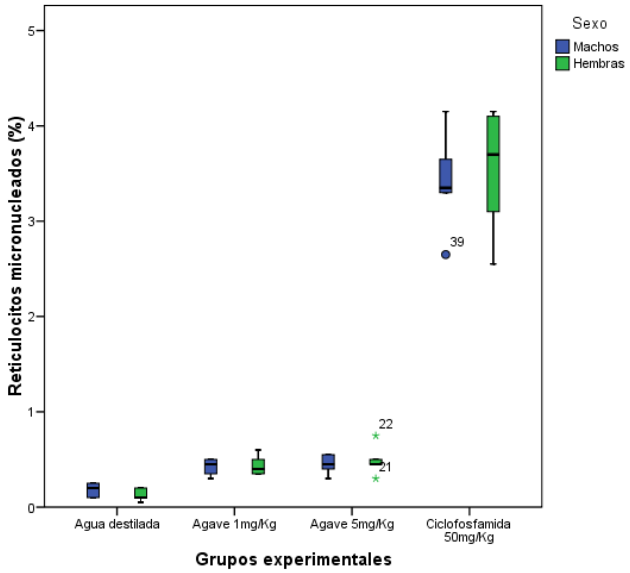


Figura 12. Porciento de reticulocitos con micronúcleos observados en 2 000 células a las 48 horas post tratamiento, en los cuatro grupos de experimentación para el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica en ambos sexos.

CAPÍTULO 5.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

El tema de genotoxicidad está siendo cada vez más común en la actualidad dada la reciente utilización de diversos productos farmacológicos en el tratamiento de enfermedades y el aumento de la contaminación ambiental. La utilización de las actuales pruebas relacionadas a este tema se justifica por el incremento de las mutaciones en las células germinales y su consecuente expresión en enfermedades genéticas, por la estrecha relación existente entre la inestabilidad genómica de las células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas y el origen ambiental del cáncer. Además de las variables normalmente usadas para evaluar el daño genético en cada uno de los ensayos existentes, pueden usarse otras con el objetivo de determinar el estado de salud general de los individuos y para comprobar el funcionamiento adecuado de la batería de ensayos, como es el caso del peso corporal.

5.1. Efecto de la administración oral de un extracto butanólico de *Agave Brittoniana* subsp. *brachypus* en el peso corporal de ratones balb/c

Al evaluar la eficacia de un extracto que puede convertirse en un fármaco, es necesario aportar pruebas de sus efectos beneficiosos en estudios *in vivo.* En la presente investigación se analizó el efecto de la administración de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* teniendo en cuenta el peso corporal.

En la Tabla III y Tabla IV se puede observar que los pesos se comportaron de forma similar para cada uno de los grupos de experimentación en los dos ensayos de genotoxicidad, según los tres momentos de medición. Para ambos ensayos, la media de los pesos de los cuatro grupos experimentales aumentó durante la primera semana de experimentación pero comenzó a descender en la última semana, a excepción del grupo de control negativo que se mantuvo aumentando durante las dos semanas como era de esperar en este tipo de control (Anexo 4 y Anexo 5). Aunque los pesos se comportaron de forma homogénea en los cuatro grupos de experimentación de los dos ensayos, se notó que la media del peso corporal disminuía mientras aumentaba la concentración de la dosis del extracto de Agave suministrado con respecto al grupo de control negativo, lo cual entra en correspondencia con lo mostrado en (Pedraza, 2006, García, 2014), según el efecto descrito para las saponinas en relación al peso corporal.

Por el contrario, el peso de los ratones del grupo de control positivo aumentó durante la primera semana de experimentación debido a que en este tiempo no les fue administrada ninguna sustancia a no ser la que correspondiese con su alimentación normal. Sin embargo, al término de la segunda semana siempre estuvo por debajo del resto de los grupos en cada momento de medición, lo cual puede ser resultado del efecto tóxico acumulativo de esta sustancia (Alonso, 2012). Este resultado se ha corroborado en estudios relacionados con este citostático (Cheah *et al.*, 2009, V. *et al.*, 2009), en los que se ha citado como un importante potenciador de malestar abdominal y diarrea, síntomas que no se describieron en ninguno de los ratones de este grupo durante el tiempo de administración antes del sacrificio, pero que aun así la anorexia no fue eliminada del todo, lo que repercute en el descenso del peso corporal observado.

Atendiendo al sexo, los ratones machos ganaron más peso que las hembras (Anexo 6) lo que constituye el comportamiento normal para los ratones de la línea usada, según los datos recogidos en (Laboratory, 2014).

5.2. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* en el Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de Médula Ósea en ratones balb/c

La prueba de micronúcleos permite una rápida orientación sobre la proliferación celular en la Médula ósea y de su composición, vista en la carencia de EPC. El Ensayo de Micronúcleos desarrollado en médula ósea se considera uno de los más usados frecuentemente en pruebas cortas de genotoxicidad *in vivo* ya que proporciona un método simple y rápido para la detección de aberraciones cromosómicas por agentes químicos y físicos (Saínz, 2001). El principal factor de realizar este ensayo en la médula ósea lo constituye la capacidad metabólica que presenta la misma, la cual se considera ilimitada en edades tempranas de los organismos.

Los resultados que se aprecian en la Tabla VI demuestran que el tratamiento con el extracto butanólico de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* por vía oral durante 14 días en ratones balb/c de ambos sexos mantuvo los índices espontáneos del número de micronúcleos en células de la médula ósea, de igual forma, este resultado no interfirió en la división celular según el índice de citotoxicidad evaluado.

El índice EPC/ENC, indicador de la proliferación celular en médula ósea, fue estadísticamente diferente en los grupos tratados con el extracto y el control positivo, lo que indica ausencia de efecto

citotóxico del tratamiento a todas las dosis. Sin embargo, se evidenció que al aumentar la dosis de administración de agave, el índice de citotoxicidad se hacía más bajo (Fig. 6) como indicador de que a concentraciones mayores los valores se pueden acercar más al control positivo. Todos estos resultados indican que el extracto no interfiere negativamente en la división celular, por lo cual es factible analizar la genotoxicidad de las dosis del extracto en cuestión atendiendo a la frecuencia de eritrocitos micronucleados (Alvis, 2010).

Este comportamiento se observó de igual forma al analizar los datos en ambos sexos. En los mismos, se evidenció que las hembras eran más susceptibles a presentar un mayor daño citotóxico (índice de citotoxicidad menor), en correspondencia con los resultados obtenidos por (Saínz, 2001, Narciandi, 2014). Según (Fernandez *et al.*, 1991), las diferencias intersexo observadas pueden ser atribuidas a las diferencias intrínsecas del metabolismo de ambos sexos. Se confirmó que los machos son menos sensibles que en las hembras a la acción de fármacos debido a la influencia de las hormonas sexuales masculinas sobre la síntesis proteica que ejercen un efecto estimulante en el metabolismo de los mismos.

Las diferencias significativas observadas en la frecuencia de aparición de EPC con MN en los grupos tratados con el extracto de agave y el control positivo están relacionadas con el índice de citotoxicidad discutido anteriormente. Todo esto indica que para las dosis evaluadas en el modelo seleccionado y en las presentes condiciones de investigación, no se establece una genotoxicidad para el extracto de Agave estudiado. Aun así, se puede observar que la media de EPC micronucleados en el grupo de administración de agave a 5 mg/kg es mayor que la del grupo de administración de agave a 1 mg/Kg, expresando de forma preliminar una relación directa entre la dosis y esta variable, por lo que a mayores dosis de administración puede existir daño al material genético. Esto puede deberse a la mayor concentración de saponinas o mezclas de estas dentro del extracto evaluado, como se ha referenciado en estudios precedentes en otras especies (Liu *et al.*, 2011). Este comportamiento fue igualmente observado al analizar el número de EPC con MN en ambos sexos, donde se ratifica que las hembras son más susceptibles a mostrar mayores frecuencias de estos valores que los machos y de la tendencia que se establece hacia el control positivo en relación a la dosis de administración.

La validación de los experimentos realizados está dada por que la media de eritrocitos micronucleados observados en 2 000 células para el control negativo (2,3 ± 1,16) se encuentra entre 0-10 MN_EPC/2

000 EPC, debido a que normalmente la frecuencia basal espontánea de formación de MN es baja y a la vez característica en los biomodelos usados en los ensayos de genotoxicidad. Además, el incremento de MN_EPC en el control positivo respecto al control negativo tiene significación estadística ($p<0,0017$ dada la corrección de Bonferroni para una significación del 99% usando el test no paramétrico de Mann Whitney) (Saínz, 2001).

5.3. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto butanólico de *Agave Brittoniana* subsp. *brachypus* en el Ensayo de Micronúcleos en reticulocitos de Sangre Periférica en ratones balb/c

El Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica de ratón ha sido validado para su uso en los estudios crónicos y está integrado satisfactoriamente dentro de los estudios de Toxicología general y en los Bioensayos de Carcinogénesis (Director *et al.*, 1996, OECD, 1997). Según (Saínz, 2001), mediante esta técnica se puede identificar los efectos clastogénicos de sustancias químicas ya que la población celular es más uniforme y más fácil de evaluar, incluyendo la toma de muestra repetida de células sanguíneas de la cola del ratón sin tener que sacrificarlos posteriormente. Debido a esto, se pueden hacer varias preparaciones en un tiempo óptimo de inducción de MN después del tratamiento por muestreos periódicos de un mismo individuo. Es por ello, que los reticulocitos de Sangre periférica pueden ser evaluados con preferencia por encima de los eritrocitos de la médula ósea, pero en esta investigación son usados para ratificar la seguridad en los datos y mejorar el tiempo de lectura de los micronúcleos.

Las diferencias significativas observadas en la frecuencia de aparición de RETsMn/2 000Ret en los grupos tratados con el extracto de agave y el control positivo ratifican los resultados obtenidos en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea. Todo esto indica que para las dosis evaluadas en el modelo seleccionado y en las presentes condiciones de investigación, no se establece una genotoxicidad para el extracto de agave estudiado.

No obstante, a pesar de que el porciento de RETsMn/2 000Ret en los grupos de administración de agave a 1 mg/Kg no difería significativamente de los del grupo de administración de agave a 5 mg/Kg, la media de dicha variable para este último grupo excedía a la del grupo de administración de agave a 1 mg/Kg, mostrando la misma tendencia observada en el Ensayo de Micronúcleos de Médula Ósea.

Al analizar el número de RETsMn/2000Ret en ambos sexos, se corrobora que las hembras son más susceptibles a mostrar mayores frecuencias de estos valores que los machos y de la tendencia que se establece hacia el control positivo en relación a la dosis de administración.

CONCLUSIONES

1. La administración oral durante 14 días del extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* no mostró efecto genotóxico en eritrocitos de médula ósea de ratones balb/c. Las dosis evaluadas arrojaron índices de citotoxicidad y estadísticamente diferentes al control positivo utilizado.
2. La administración oral durante 14 días del extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* no mostró efecto genotóxico en reticulocitos de sangre periférica de ratones balb/c. Las dosis evaluadas arrojaron índices genotoxicidad estadísticamente diferentes al control positivo utilizado.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar los estudios de genotoxicidad donde se analice el daño a la estructura primaria del ADN, en los genes y a nivel celular.

2. Evaluar concentraciones mayores del extracto para definir su rango de seguridad biológica.

3. Realizar estudios a dosis repetida del extracto (28 días) donde se analicen variables hemoquímicas, hematológicas, patológicas e histológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdella, E. M. (2012) Short-term comparative study of the cyclophosphamide genotoxicity administered free and liposome-encapsulated in mice. *Iranian Journal of Cancer Prevention.* 5: 51-60.

Acevedo, P. y Strong, M. T. (2012) *Catalogue of seed plants of the West Indies*Washington D.C.

AETOX (2014) *Glosario de términos toxicológicos*. [En línea] Disponible desde: http://www.aetox.es/glosario-toxicologico/glosater-f-g-h-i/. [Consultado: 3 de diciembre del 2014].

Alarcón, J. H., David, V. S., Ortiz, J. L. y Herrera, F. M. (2007) Prueba de micronúcleos en eritrocitos de Sabaletas (*Brycon henni E*.) presentes en el río Porce y en el embalse Porce II, Antioquía. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuicola.* 3: 238-245.

Alonso, A. (2012) Evaluación preclínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet como suplemento nutricional antioxidante. Instituto de Farmacia y Alimentos: Universidad de La Habana.

Alvis, R. (2010) Detección del efecto antimutagénico del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", utilizando la prueba *in vivo* de micronúcleos. Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Figueroa, J. y Sánchez, D. L. (2009) Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Revista de Toxicología en Línea (RETEL).* 23: 23-40.

Arencibia, D. F., Rosario Fernández, L., Suárez Fernández, Y. y Soroa Millán, Y. (2010) Consideraciones importantes acerca de la cuarentena de ratas y ratones como biomodelos experimentales en toxicología. Revisión.

Arencibia, D. F., Rosario Fernández, L. A., Suárez Fernández, Y. E. y Vidal Novoa, A. (2011a) Evaluación y comparación de cuatro líneas de ratones como biomodelo en ensayos de genotoxicidad. *Biocyt biología, ciencia y tecnología.* 4: 240-246.

Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Suárez, Y. E. y Delgado, L. (2011b) Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley. *InVet.* 13: 53-61.

Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Suarez, Y. E. y Vidal, A. (2013) Comparison of micronuclei frequency in bone marrow cells of three rat lines. *Cytology and Genetics.* 47: 118-123.

Arencibia, D. F. (2014) Evaluación de la eficiencia de diferentes biomodelos de los murinos en los ensayos de genotoxicidad mediante técnicas citogenéticas. La Habana: Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".

Arencibia, D. F. (2015) Estudios de toxicología preclínica con perfil regulatorio para productos naturales vs productos biotecnológicos (vacunas). In: *Toxicología preclínica.* Instituto Finlay.

Arribas, O. G. (2002) Efectos biológicos de campos magnéticos de muy baja frecuencia y radiofrecuencia en presencia de metales pesados: cadmio y mercurio. In: *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I.* Facultad de Ciencias Químicas, Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Baber, N. (1994) International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). *British journal of clinical pharmacology.* 37: 401-404.

Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. y Warwick, M. C. (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. pp. 1-32.

Benavides, F. J. y Guénet, J.-L. (2003) Las mutaciones. *Manual de genética de roedores de laboratorio.* pp. 201-227. Universidad de Alcalá de Henares SECAL.

Boada, L. D. (2004) Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer.* 1: 1-9.

Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.-p., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E. y Fenech, M. (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 543: 155-166.

Botham, P. A. (2002) Acute systemic toxicity. *Ilar Journal.* 43: 27-30.

Brusick, D. J. (1999) Genetic toxicology. *Toxicology.* pp. 127-149. London, United Kingdom: Academic Press.

Carranza, L. P. (2011) Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de Indias. In: *DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA.* Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

CCAC (2010) CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Ottawa, Canadá.

CECMED (2012) Buenas prácticas de laboratorio no clínico. (CECMED, ed.). pp. 1-120.

CECMED. (2001) Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano. Ciudad de La Habana: MINSAP.

Corredor , W. S., Mora, C. C., Escobar, P. S., Cruz, P. E. y Velasco, Y. M. (2012) Inducción de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en *Astyanax* gr. *bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *Orinoquia suplemento.* 16: 237-247.

Costa, J. H., Lyra, M. M., Lima, C. R., Arruda, V. M., Araujo, A. V., Ribeiro e Ribeiro, A., Arruda, A. C., Fraga, M., Lafayette, S. S. y Wanderley, A. G. (2006) Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) en ratas Wistar. *Acta Farmacéutica Bonaerense.* 25: 425-428.

Cheah, K., Howarth, G. S., Yazbeck, R., Wright, T. H., Whitford, E. J., Payne, C., Butler, R. N. y Bastian, S. E. P. (2009) Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biology & Therapy.* 8: 382-390.

Chhabra, R., Huff, J., Schwetz, B. y Selkirk, J. (1990) An overview of prechronic and chronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environmental health perspectives.* 86: 313-329.

da Silva, B. P. y Parente, J. P. (2007) A New Bioactive Steroidal Saponin from Agave brittoniana. *Zeitschrift Fur Naturforschung B.* 62: 1193-1198.

Director, A. E., Nath, J., Ramsey, M. J., Swiger, R. R. y Tucker, J. D. (1996) Cytogenetic analysis of mice chronically fed the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5b] pyridine. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 359: 53-61.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. y Zeiger, E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 534: 65-75.

Fernandez, S., Rendón, A., A., d. l. C. y López, M. (1991) Estudio genotóxico del Ateromixol (PPG), un nuevo medicamento hipolipemiante. *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas.* 22: 98-101.

Franco de Diana, D., Vega, C., Segovia Abreu, J. A. y Castiglioni Serafini, D. P. (2012) Evaluación genotóxica por el test de micronúcleos y el ensayo del cometa en estudiantes de odontología expuestos a rayos X durante las radiografías dentarias. *Seguridad y Medio Ambiente.* 32: 44-53.

Gámez, R. (2007) Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 38: 204-208.

García, A. L., Vizoso Parra, A., Ramos Ruiz, A., Piloto Ferrer, J., Pavón González, V. y Rodríguez Leyes, E. A. (2001) Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de Aloe vera L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 6: 52-55.

García, M. P. (2014) Efecto del extracto acetónico de *Agave angustifolia* Haw en un modelo de artritis experimenta en ratón albino. . Centro de Desarrollo de Productos Bióticos: Instituto Politécnico Nacional.

Garthoff, B. (1995) Alternative testing in drug research and development - The validation issue. *Toxicology in vitro.* 9: 789-793.

Giner Larza, E. M. y Castillo García, E. (2003) Fitoterapia y diabetes. *Revista de Fitoterapia.* 3: 113-122.

Guerra, J. O. (2005) Compuestos con actividad antiparasitaria del *Agave brittoniana* T. In: *Departamento de Química.* España: Universidad de Cádiz.

Guerra, J. O., Meneses, A., Simonet, A. M., Macías, F. A., Nogueiras, C., Gómez, A. y Escario, J. A. (2008) Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical.* 56: 1645-1652.

Gutiérrez, J. M. (2013) Micronúcleos en peces como indicadores de calidad ambiental en estuarios de la costa uruguaya. In: *Facultad de Ciencias.* Montevideo, Uruguay: Universidad de la República de Uruguay.

Hartl, D. L. y Jones, E. W. (1998) Mutation, DNA Repair, and Recombination. En: Hauck, J. H. (ed.). *Genetics: Principles and Analysis.* pp. 555-598. Massachusets: Jones and Bartlett Publishers.

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Oleson, F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F. y Shimada, H. (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 312: 293-304.

Hermano, L. y Hermano, A. (1946) *Flora de Cuba* La Habana.

Inkanatural (2015) *Agave: Propiedades y Usos Tradicionales*. [En línea] Disponible desde: http://www.inkanatural.com/es/arti.asp?ref=agave. [Consultado: 8 de abril del 2015].

Kalachaveedu, M., Papacchan, S., Sanyal, S., Koshy, T. y Telapolu, S. (2014) Isolation and evaluation of cytogenetic effect of Brahmi saponins on cultured human lymphocytes exposed in vitro. *Natural product research.* 29: 1-4.

Kirkland, D. J. (1994) Statistical evaluation of mutagenicity test data: recommendations of the UK Environmental Mutagen Society. *Environmental health perspectives.* 102: 43-47.

Laboratory, T. J. (2014) *Body weight information: JAX® Mice Strain BALB/cJ*. [En línea] Disponible desde: http://jaxmice.jax.org/strain/000651.html. [Consultado: 7 de mayo 2015].

Liu, W., Di Giorgio, C., Lamidi, M., Elias, R., Ollivier, E. y De Méo, M. (2011) Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. *Journal of ethnopharmacology.* 137: 176-183.

López, M. L. (2006) Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: Características, administración y efectos adversos. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia.* 25: 82-88.

Maffei, F., Angelini, S., Forti, G. C., Lodi, V., Violante, F. S., Mattioli, S. y Hrelia, P. (2002) Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis.* 17: 405-409.

Marczewska, J., Karwicka, E., Drozd, J., Anuszewskal, E., Sliwinska, A., Nosov, A. y Olszowska, O. (2011) Assessment of cytotoxic and genotoxic activity of alcohol extract of Polyscias filicifolia shoot, leaf, cell biomass of suspension culture and saponin fraction. *Acta Pol Pharm.* 68: 703-710.

Martínez, C. y Gómez, S. (2007) Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental.* 23: 185-200.

Martínez, L. R. B. (2009) Modelo experimental para evaluar la genotoxicidad transferida por leche materna durante la lactancia. In: *Facultad de Medicina, Centro Universitario de Investigación Biomédica.* Colima: Universidad de Colima.

Matheus, T. y Bolaños, A. (2014) Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.* 18: 18-26.

Miranda, L., Gómez, R., Rojas, G., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Colmenares, M., Barreto, S., Balza, A. y Zavala, L. (2013) Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *Journal of occupational health.* 55: 195-203.

Misra, R. R. y Waalkes, y. M. P. (2001) Toxicología genética. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.* pp. 33.31-33.83. España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones.

Montero, A. R., Arnáez, G. P., Esperón, N. F., Barro, A. B., Pérez, M. A. y Rodríguez, A. M. (2001) Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología.* 18: 75-78.

Moreira, V., Dias, A., Martins, A., Lima, M., Serra, I., Ribeiro, M., Nascimento, F. y Pereira, S. (2013) Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from *Julocroton triqueter* (*Euphorbiaceae*). *Genetics and molecular research: GMR.* 12: 1132.

Mostafalou, S. y Abdollahi, M. (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology.* 268: 157-177.

Mwale, M., Masika, P. y Materechera, S. (2013) Assessment of the potential toxic effects of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm in rats. *Journal of Medicinal Plant Research.* 7: 2514-2522.

Narciandi, J. (2014) Evaluación mutagénica y genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet. Instituto de Farmacia y Alimentos: Universidad de La Habana.

OECD (1997) Guideline for the testing of chemical. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In: *DRAFT TG 474.* (OECD, ed.). París: OECD Publishing.

Paredes, B. y Enrique, L. (2010) Determinación de la actividad insecticida de la saponina de Quinua (*Chenopodium quinoa*) hidrolizada y no hidrolizada sobre *Drosophila melanogaster*.

Pedraza, L. G. G. (2006) Evaluación de jarabe de maguey mezcalero (*Agave salmiana*) en ratas diabéticas. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina: Universidad Autónoma de San Luis Potosi.

Piccirillo, V. J. (1999) Repeated-dose toxicity studies. *Product Safety Evaluation Handbook, ed. Gad SC, Marcel Dekker, Inc. US.* 5: 201-222.

Plant, N. (2003) Toxicology case studies. *Toxicity case studies.* pp. 63. United States of America: Garland Science.

Repetto M. y G., R. (2009) *Toxicología fundamental*. Cuarta edición. Madrid.

Saínz, O. (2001) Estandarización de tres técnicas de genotoxicidad y evaluación genotóxica del bioactivo G-1 y del BIOPLANT. Instituto de Farmacia y Alimentos: Universidad de La Habana.

Shayne, C. G. (2007) The mouse. Toxicology. *Animal models in toxicology.* pp. 24-72. New York: Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group.

Silva, G. M., Souza, A. D., Lara, L. S., Mendes, T. P., Silva, B. d., Lopes, A. G., Caruso-Neves, C. y Parente, J. P. (2005) A new steroidal saponin from *Agave brittoniana* and its biphasic effect on the Na+-ATPase activity. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences.* 60: 121-127.

Terradas, M., Martín, M., Tusell, L. y Genescà, A. (2010) Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 705: 60-67.

Thakur, M., Melzig, M. F., Fuchs, H. y Weng, A. (2011) Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy.* 1: 19-29.

Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. y Sasaki, Y. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis.* 35: 206-221.

Torres, O., Zavala, M. G., Flores, A. y Ramos, M. (2013) Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente.* 8: 4-11.

V., S., KK., V. y N., N. (2009) Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Invest New Drugs.* 27: 21-30.

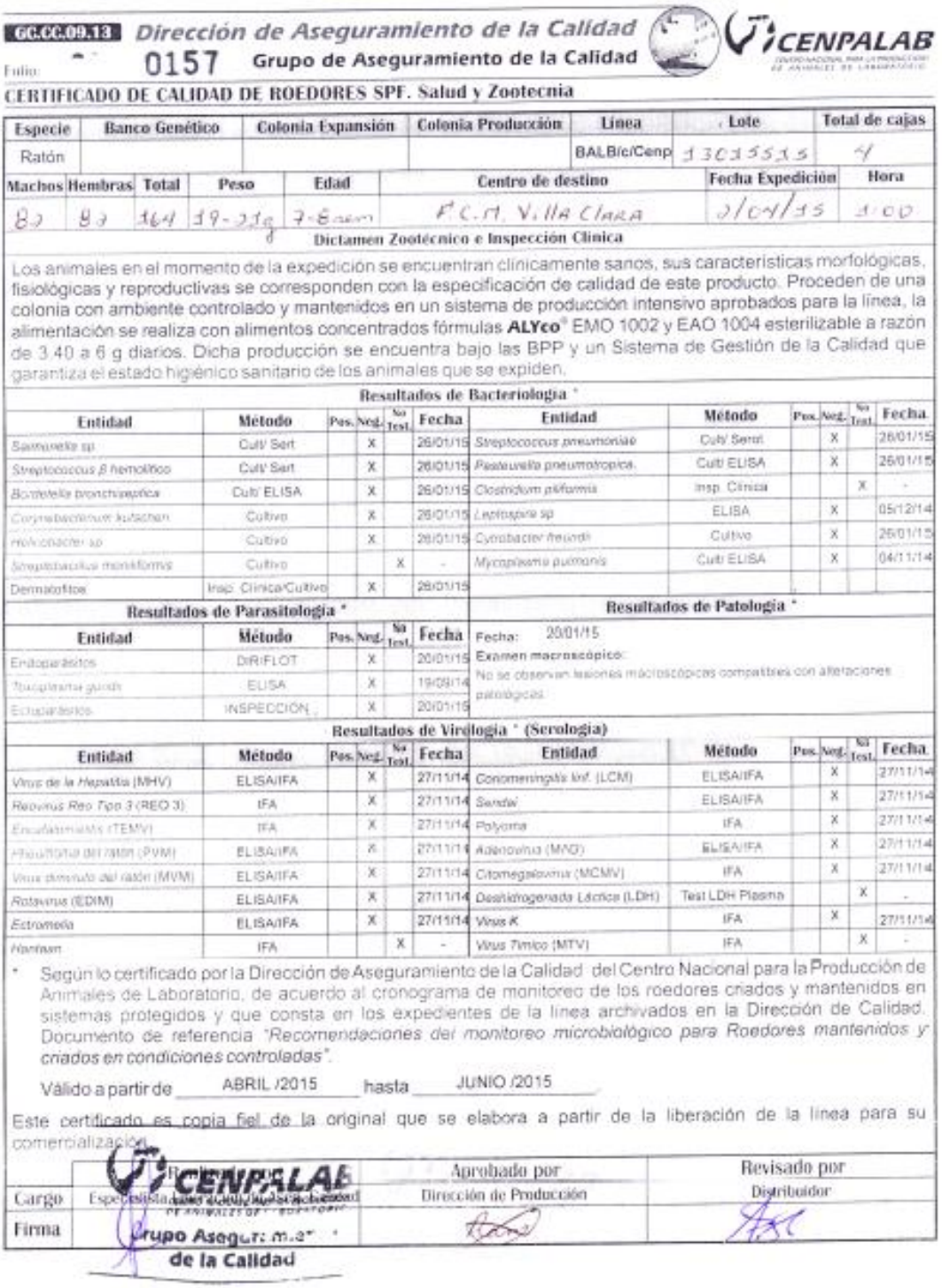
Villasana, A. M. S. (2008) Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*. Prueba de Ames. En: Ecología, I. N. d. (ed.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* pp. 319-344.

Weichenthal, S., Moase, C. y Chan, P. (2010) A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environmental health perspectives.* 118: 1117-1125.

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005) El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos *An. Sist. Sanit. Navar*. 28: 227-236.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de Calidad de Roedores SPF para la línea de ratones balb/c usada en la experimentación. Salud y Zootecnia. CENPALAB



GC.CC.09.13 Dirección de Aseguramiento de la Calidad

Folio: 0157 Grupo de Aseguramiento de la Calidad

CENPALAB

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Ratón				BALB/c/Cenp	130315115	4

Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
80	84	164	19-22g	7-8 sem	C.N. Villa Clara	2/04/15	9:00

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmulas **ALYco**® EMO 1002 y EAO 1004 esterilizable a razón de 3 40 a 6 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha
Salmonella sp	Cult/ Sert		X		26/01/15	*Streptococcus pneumoniae*	Cult/ Sensit.		X		26/01/15
Streptococcus β hemolítico	Cult/ Sert		X		26/01/15	*Pasteurella pneumotropica*	Cult/ ELISA		X		26/01/15
Bordetella bronchiseptica	Cult/ ELISA		X		26/01/15	*Clostridium piliformis*	Insp. Clínica			X	-
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		26/01/15	*Leptospira sp*	ELISA		X		05/12/14
Helicobacter sp	Cultivo		X		26/01/15	*Cytrobacter freundi*	Cultivo		X		26/01/15
Streptobacillus moniliformis	Cultivo			X	-	*Mycoplasma pulmonis*	Cult/ ELISA		X		04/11/14
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		26/01/15						

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha
Endoparásitos	DIRIFLOT		X		20/01/15
Toxoplasma gondii	ELISA		X		19/09/14
Ectoparásitos	INSPECCIÓN		X		20/01/15

Resultados de Patología *

Fecha: 20/01/15

Examen macroscópico:

No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.

Resultados de Virología * (Serología)

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA		X		27/11/14	*Coriomeningitis linf. (LCM)*	ELISA/IFA		X		27/11/14
Reovirus Reo Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		27/11/14	*Sendai*	ELISA/IFA		X		27/11/14
Encefalomielitis (TEMV)	IFA		X		27/11/14	*Polyoma*	IFA		X		27/11/14
Neumonía del ratón (PVM)	ELISA/IFA		X		27/11/14	*Adenovirus (MAD)*	ELISA/IFA		X		27/11/14
Virus mínimo del ratón (MVM)	ELISA/IFA		X		27/11/14	*Citomegalovirus (MCMV)*	IFA		X		27/11/14
Rotavirus (EDIM)	ELISA/IFA		X		27/11/14	*Deshidrogenada Láctica (LDH)*	Test LDH Plasma			X	-
Ectromelia	ELISA/IFA		X		27/11/14	*Virus K*	IFA		X		27/11/14
Hantaan	IFA			X	-	*Virus Timico (MTV)*	IFA			X	-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia *"Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas"*.

Válido a partir de ABRIL /2015 hasta JUNIO /2015

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

	Elaborado por	Aprobado por	Revisado por
Cargo	Especialista [illegible]	Dirección de Producción	Distribuidor
Firma			

CENPALAB Grupo Aseguramiento de la Calidad

Anexo 2. Certificado de autorizo de alimento concentrado para la línea balb/c usada en la experimentación

FR.CA.01.14 0452

Dirección de Alimentación y Nutrición
Grupo de Producción de Alimentos Concentrados

CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

CERTIFICADO DE AUTORIZO DE ALIMENTO CONCENTRADO

Fórmula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación
EAO 1004	II	126/2015	05/03/2015	Pellet Ø 15 mm.

Especificaciones para su uso

Dieta completa concentrada para el mantenimiento y reproducción de ratas y ratones de laboratorio. Todo propósito Esterilizable. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 60 días a partir de la fecha de fabricación.

Componentes

Maíz, Trigo, Soya, Pescado, Azucar, Aceite Vegetal, Fosfato Dicálcico, Carbonato de calcio, Sal Común, Pre-Mezcla Minero-Vitaminica.

Análisis calculado *

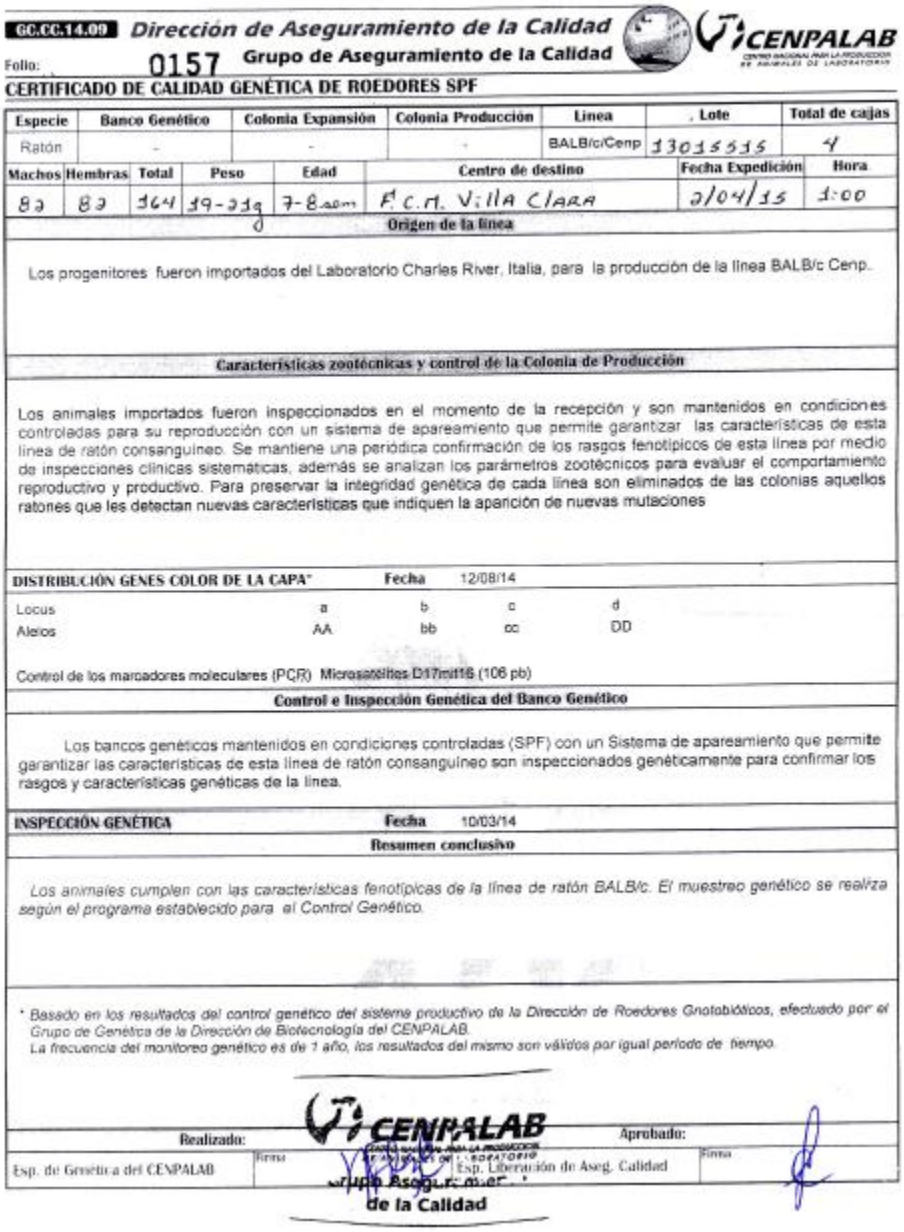
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%	19.50	Calcio	%	1.24
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g	2.80	Fósforo	%	0.86
Fibra bruta (Max.)	%	3.50	Relación Calcio/ Fósforo	%	1.43
Grasa bruta (Min.)	%	2.40			

* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutricion del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.

Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.

	Cargo	Firma
Realizado por:	Dirección de Producción	
Revisado por:	Distribuidor	

Anexo 3. Certificado de calidad genética de roedores SPF para la línea balb/c usada en la experimentación



GC.CC-14.09 **Dirección de Aseguramiento de la Calidad**

Folio: 0157 **Grupo de Aseguramiento de la Calidad**

CENPALAB

CERTIFICADO DE CALIDAD GENÉTICA DE ROEDORES SPF

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Ratón	-	-	-	BALB/c/Cenp	13015515	4

Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
82	82	164	19-21g	7-8sem	F.C.M. Villa Clara	2/04/15	1:00

Origen de la línea

Los progenitores fueron importados del Laboratorio Charles River, Italia, para la producción de la línea BALB/c Cenp.

Características zootécnicas y control de la Colonia de Producción

Los animales importados fueron inspeccionados en el momento de la recepción y son mantenidos en condiciones controladas para su reproducción con un sistema de apareamiento que permite garantizar las características de esta línea de ratón consanguíneo. Se mantiene una periódica confirmación de los rasgos fenotípicos de esta línea por medio de inspecciones clínicas sistemáticas, además se analizan los parámetros zootécnicos para evaluar el comportamiento reproductivo y productivo. Para preservar la integridad genética de cada línea son eliminados de las colonias aquellos ratones que les detectan nuevas características que indiquen la aparición de nuevas mutaciones

DISTRIBUCIÓN GENES COLOR DE LA CAPA* **Fecha** 12/08/14

Locus	a	b	c	d
Alelos	AA	bb	cc	DD

Control de los marcadores moleculares (PCR) Microsatélites D17mit16 (106 pb)

Control e Inspección Genética del Banco Genético

Los bancos genéticos mantenidos en condiciones controladas (SPF) con un Sistema de apareamiento que permite garantizar las características de esta línea de ratón consanguíneo son inspeccionados genéticamente para confirmar los rasgos y características genéticas de la línea.

INSPECCIÓN GENÉTICA **Fecha** 10/03/14

Resumen conclusivo

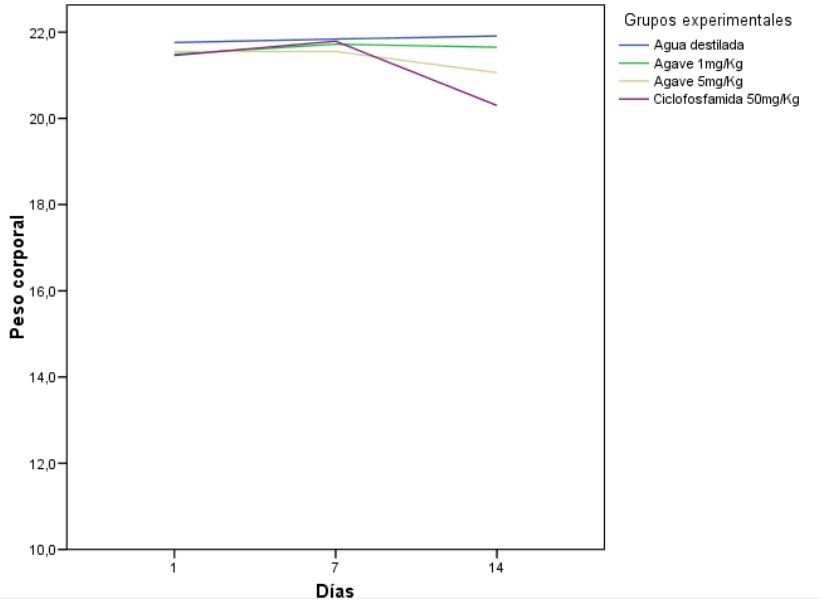
Los animales cumplen con las características fenotípicas de la línea de ratón BALB/c. El muestreo genético se realiza según el programa establecido para el Control Genético.

* *Basado en los resultados del control genético del sistema productivo de la Dirección de Roedores Gnotobióticos, efectuado por el Grupo de Genética de la Dirección de Biotecnología del CENPALAB.*
La frecuencia del monitoreo genético es de 1 año, los resultados del mismo son válidos por igual período de tiempo.

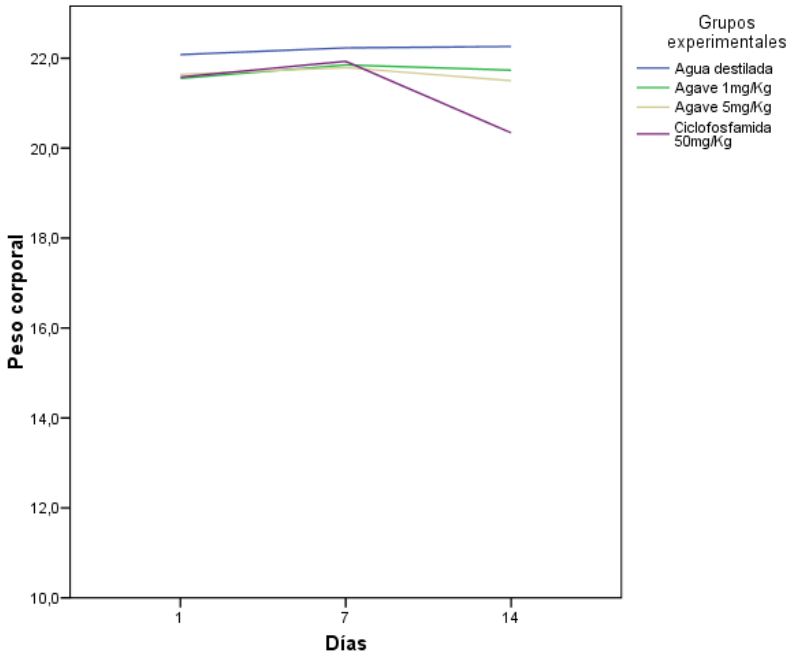
Realizado:		Aprobado:	
Esp. de Genética del CENPALAB	Firma	Esp. Liberación de Aseg. Calidad	Firma

CENPALAB Grupo Aseguramiento de la Calidad

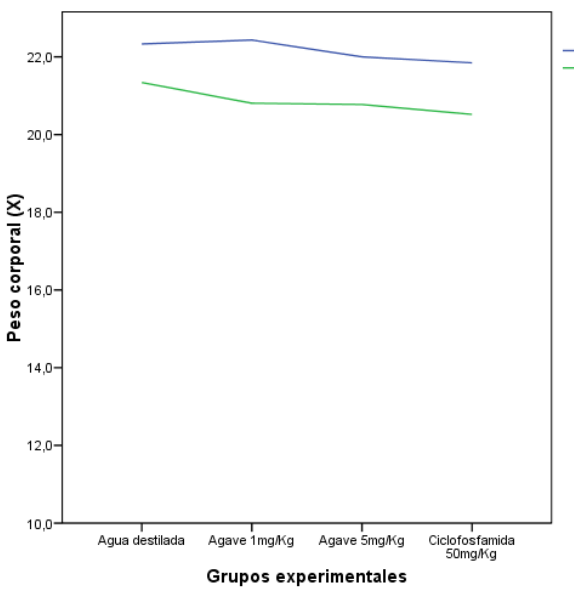
Anexo 4. Comportamiento de la media del peso corporal (g) de los ratones de cada grupo experimental en los días 1, 7 y 14 de iniciado el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea.



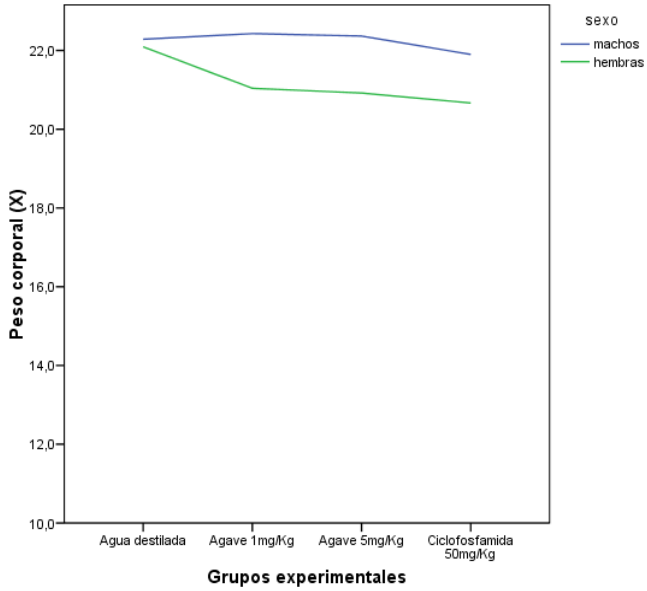
Anexo 5. Comportamiento de la media del peso corporal (g) de los ratones de cada grupo experimental en los días 1, 7 y 14 de iniciado el Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica.



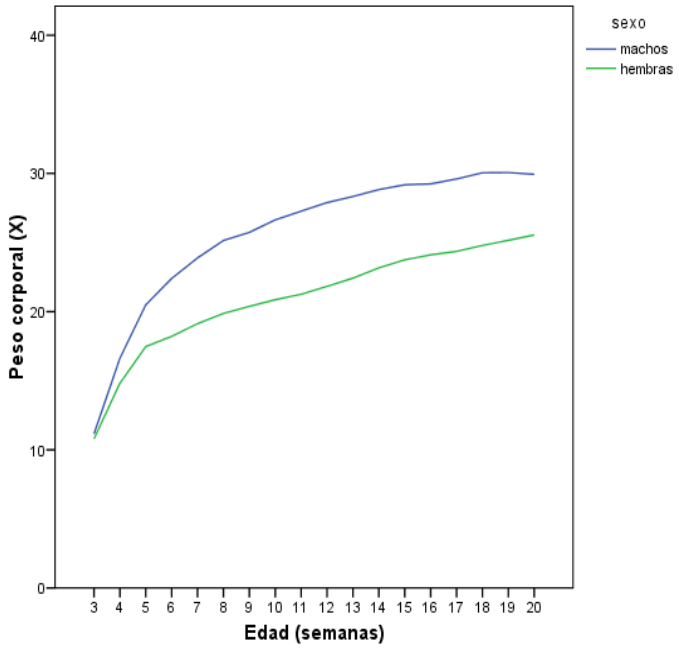
Anexo 6. Peso corporal (g) de los ratones balb/c en ambos sexos para (a) Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea, (b) Ensayo de Micronúcleos en Sangre Periférica y (c) datos de referencia internacional sobre el peso corporal de ratones balb/c de 3-20 semanas (Fuente: http://jaxmice.jax.org/strain/000651.html).



a)



b)



c)