

Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina

Daniel Francisco Arencibia^{1*}, Alexis Vidal², Luis Alfredo Rosario³, Yolanda Emilia Suárez⁴, Livan Delgado⁵

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba. AP 16017.

²Facultad de Biología (U.H). Avenida 25 e/ H y J, Vedado, municipio Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

³Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H). Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba.

⁴Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

⁵Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Avenida 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

email: darencibia@finlay.edu.cu

En este trabajo se evaluó la línea de ratones Balb/c, de ambos sexos, como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. Se formaron cinco grupos experimentales/sexo: al primero se le administró NaCl al 0,9%, al segundo y al tercero ciclofosfamida y al cuarto y quinto bleomicina. Todos los medicamentos fueron suministrados por vía intraperitoneal, con diseños de tratamientos diferentes y dosis de 50 mg/kg en los tres primeros grupos y de 20 mg/kg en los dos últimos. Se obtuvo como resultado una mayor inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y un mayor índice de citotoxicidad por el uso de la ciclofosfamida, administrada en dos ocasiones antes del sacrificio, con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones. Esto constituyó, bajo nuestras condiciones experimentales, el mejor diseño para inducir un número considerable de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones, siendo estos resultados útiles para evaluar drogas con efecto antígeno tóxico y pudiera servir también como control positivo en estudios de mutagénesis o genotoxicidad.

Palabras clave: Inducción, micronúcleos, ratones Balb/c, ciclofosfamida, bleomicina.

Introducción

El ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores está incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras, tales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y la agencia estadounidense para la Protección del Medio Ambiente (EPA) (1,2). Es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.

Este sistema permite registrar in vivo la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas (1). Por lo general en los estudios de genotoxicidad in vivo se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL) (1,2).

La primera constituye un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas como consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos (2); la segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro, produciendo radicales libres (2,3).

Ambas drogas son utilizadas con gran efectividad como antineoplásicas. La CF pertenece al grupo de cloroetilaminas. Con el desarrollo de este agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral, considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular (4). La BL es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales (2, 3). Las células tumorales son más susceptibles a la BL durante la proliferación activa y son demoradas específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular (4).

Los ensayos de genotoxicidad son obligatorios en vacunas de ADN y en todo producto biotecnológico, además se justifica aún más para aquellos que se obtengan por la tecnología del ADN recombinante.

En vacunas se exigen cuando estas van a ser administradas a embarazadas, niños, mujeres y hombres en edad reproductiva.

Estos estudios sirven de herramienta para conocer si su producto es capaz de interactuar con el material genético y qué tipo de daño ocasiona y permiten enriquecer el registro sanitario de su producto en la temática de seguridad.

* Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

La vacuna cubana VA-MENGOC-BC® fue evaluada en el ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratones adultos, donde se obtuvieron resultados favorables en cuanto a seguridad (5); así como vax-SPIRAL® fue evaluada en el ensayo de micronúcleos materno y trasplacentario (6). Recientemente el adyuvante AFCo1 fue evaluado mediante el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide (7). Por lo que se hace evidente la necesidad y utilidad de los ensayos de genotoxicidad en el campo de la seguridad en la industria biotecnológica y farmacéutica.

En nuestros días existe gran polémica sobre los diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutagénicas como controles positivos en los ensayos de mutagénesis, genotoxicidad y antigenotoxicidad. Se han utilizado diversas, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal respondedor a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

Proponemos como biomodelo ideal en los estudios de genotoxicidad la línea de ratón Balb/c en ambos sexos, ya que se han obtenido los resultados espontáneos más bajos e inducidos aceptables de variables que se miden en los estudios de genotoxicidad, al ser comparadas con otras líneas que se comercializan en Cuba, como la NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp (8,9).

En estudios preliminares se obtuvo como resultado que esta línea de ratón es genéticamente más estable que las mencionadas anteriormente, al presentar en ambos sexos los índices de genotoxicidad espontánea más bajos, con diferencias significativas marcadas en los índices encontrados en las demás líneas de ratones evaluadas, además de responder mejor a la acción de sustancias que manifiestan poca o moderada genotoxicidad (8,9). Lo que ha permitido clasificar sustancias con acción genotóxica o mutagénica dudosa, disminuyendo en gran medida el margen de error (1).

Por este motivo en el presente trabajo decidimos evaluar la línea de ratones Balb/c de ambos sexos como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por CF y BL. Administrando estos mutágenos por vía intraperitoneal (i.p), diferenciando las respuestas cuando son administrados 48 y 24 h antes del sacrificio y cuando solo son administrados 24 h antes del mismo.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio.

La temperatura se mantuvo entre 23 ± 2 °C, la humedad entre $60 \pm 10\%$ y los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 h. El alimento que se les administró durante todo el experimento fue pienso estándar para esta especie, preparado en el CENPALAB, y agua, ambos *ad libitum*. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (10).

Administración y dosificación

En los grupos experimentales la sustancia se administraba en el horario de la mañana y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratones/grupo/sexo/.

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% (BDH). Administrado por vía i.p, en dosis de 2 mL/kg en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre ambas administraciones (8).

En los grupos experimentales 2 y 3 se utilizó la CF (Lemri S.A bajo la marca LEDOXINA), administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 h antes del sacrificio programado para el grupo dos, y 24 h antes del sacrificio programado para el grupo 3. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg (8), por vía i.p, en disolución salina (NaCl) al 0,9%, administrado a razón de 10 mL/kg (11). En los grupos experimentales 4 y 5 se utilizó la BL, adquirida de los Laboratorios Pisa S.A., de C.V. México, bajo el nombre Blomindex (polvo), administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 h antes del sacrificio programado para el grupo 4 y 24 h antes del sacrificio programado para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 20 mg/kg (12), por vía i.p, en disolución salina (NaCl) al 0,9%, administrado a razón de 10 mL/kg.

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

Sacrificio

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical con previa atmósfera de éter; en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 4 el sacrificio fue 24 h después de la segunda administración de cada sustancia, en el caso de los

grupos experimentales 3 y 5 el sacrificio se realizó 24 h posteriores a la única administración del mutágeno.

Exámenes realizados

Ensayo de micronúcleos en médula ósea. Se extrajo un fémur de cada animal y la cavidad medular se lavó gentilmente por flujo, introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La médula obtenida, diluida con el SBF, se centrifugó a 1 000 rpm por 10 min; tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos (13). Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 h a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 min para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 min (13). Las láminas fueron codificadas.

El análisis se realizó por tres observadores independientes y a ciegas, utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo (13).

Análisis estadístico

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables continuas frecuencia de EP, portadores de micronúcleos e índice de citotoxicidad (EP/EN) (13). Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de las distribuciones y la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianza. El nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0,05$. Las variables categóricas (número total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN) se analizaron mediante la prueba de Chi-Cuadrado (13), el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0,01$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), Versión 6.

Resultados

En el presente estudio no fueron encontrados animales con signos clínicos de toxicidad en ninguno de los grupos experimentales.

En la Tabla 1 se observa que tanto los grupos tratados con CF como los tratados con BL difieren significativamente con el grupo control negativo en ambos sexos, en cuanto el índice de citotoxicidad dado por la relación (EP/EN), y el porcentaje de eritrocitos policromatófilos que contienen micronúcleos (índice de genotoxicidad), para $p < 0,05$.

Se corroboró que la relación (EP/EN) en esta línea de ratón se encuentra en el rango de $1,17 \pm 0,03$ en los machos y de $1,13 \pm 0,08$ en las hembras y que el índice de citotoxicidad se encuentra en los machos entre $0,16 \pm 0,02\%$ y en las hembras está entre $0,15 \pm 0,02\%$.

Además, ambas sustancias mutagénicas igualmente difirieron con el grupo control negativo en ambos sexos, teniendo en cuenta el número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos. El número total de micronúcleos espontáneos en esta especie para el caso de los machos fue de 26 y de 22 en las hembras. Solo la administración de la CF en dos ocasiones con intervalos de 24 h difirió de forma significativa con los demás grupos, tanto en el índice de citotoxicidad como de genotoxicidad ($p < 0,05$). Se obtienen resultados de $0,88 \pm 0,03$ de relación (EP/EN) en los ratones machos y de $0,87 \pm 0,01$ en las hembras, en tanto los resultados del índice de genotoxicidad se encuentran entre $1,84 \pm 0,32$ en los machos y $1,59 \pm 0,84$ en las hembras.

En la Tabla 2 se aprecia que nuevamente la CF administrada 48 y 24 h antes del sacrificio difirió con el otro esquema en que fue administrada y con los dos esquemas en que se evaluó la BL, teniendo en cuenta el número total de micronúcleos ($p < 0,01$), los cuales fueron para el caso de los machos de 265 y en las hembras de 228.

Se encontró que la CF administrada en una sola ocasión no difirió en ambos sexos con los dos esquemas propuestos para la BL, ni tampoco hubo diferencias significativas entre estos dos últimos. Al tenerse en cuenta la relación (EP/EN), el porcentaje de eritrocitos policromáticos con micronúcleos ($p < 0,05$) y el número total de micronúcleos ($p < 0,01$).

Tampoco se observó diferencias significativas entre sexos, tanto en los índices espontáneos como en los inducidos en los diferentes tratamientos en que fueron utilizados estos dos mutágenos.

Discusión

El hecho de no haber encontrado animales con síntomas clínicos de toxicidad nos permitió afirmar que las sustancias utilizadas según la dosis y vía empleadas no son tóxicas a nivel sistémico, sí a nivel de células de la médula ósea analizadas. Resultados que concuerdan con los hallados por nosotros al evaluar índices espontáneos en este biomodelo en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea (8,11).

Los resultados espontáneos encontrados concuerdan con los reportados hasta el momento, al utilizar esta línea de ratones como biomodelo en este ensayo (5,8). Además concuerdan al utilizar la CF como agente clastogénico eficiente, al administrarse en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre administraciones (5,8).

Tabla 1. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos tratados con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupo	n	EP ^T	EN ^T	EP/EN ^T	MN-EP (%) ^T
Machos					
CN ^a	10	1077 ± 11,10	923 ± 8,37	1,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02
CF1 ^a	10	938 ± 16,17 aAc	1062 ± 16,10 aAc	0,88 ± 0,03 aAc	1,84 ± 0,30 aAc
CF2 ^a	10	962 ± 6,56 bc	1038 ± 4,11 bc	0,93 ± 0,02 bc	1,30 ± 0,24 bc
BL1 ^a	10	970 ± 7,49 bc	1030 ± 6,32 bc	0,94 ± 0,02 bc	1,20 ± 0,36 bc
BL2 ^a	10	978 ± 3,99 bc	1022 ± 8,48 bc	0,96 ± 0,01 bc	1,25 ± 0,20 bc
Hembras					
CN ^a	10	1063 ± 9,84	937 ± 8,81	1,13 ± 0,08	0,15 ± 0,02
CF1 ^a	10	929 ± 22,61 aAc	1071 ± 12,47 aAc	0,87 ± 0,01 ^a Ac	1,59 ± 0,84 aAc
CF2 ^a	10	969 ± 7,22 bc	1031 ± 7,31 bc	0,94 ± 0,02 bc	1,02 ± 0,13 bc
BL1 ^a	10	974 ± 4,22 bc	1026 ± 4,67 bc	0,95 ± 0,01 bc	1,07 ± 0,09 bc
BL2 ^a	10	984 ± 2,24 bc	1016 ± 2,24 bc	0,97 ± 0,01 bc	1,12 ± 0,04 bc

^TEl análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con p<0,05 prefijada (X media; DE desviación estándar, para las dos réplicas experimentales).

CF1=Ciclofosfamida administrada 48 y 24 h antes del sacrificio. CF2=Ciclofosfamida administrada 24 h antes del sacrificio. BL1=Bleomicina administrada 48 y 24 h antes del sacrificio. BL2=Bleomicina administrada 24 h antes del sacrificio. ^aAdministración por vía ip. Determinaciones en 2 000 células/animal. Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo. (A) Resultados que difieren al comparar los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo (CN).

Tabla 2. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos tratados con ciclofosfamida y bleomicina.

Grupo	n	MN ^T	EP (1 MN) ^T	EP (2 MN) ^T	EP (+2 MN) ^T
Machos					
CN ^a	10	26	18	7	1
CF1 ^a	10	265aAc	163aAc	87aAc	15aAc
CF2 ^a	10	187bc	126bc	57bc	4bc
BL1 ^a	10	172bc	101bc	64bc	7bc
BL2 ^a	10	180bc	111bc	60bc	9bc
Hembras					
CN ^a	10	22	14	7	1
CF1 ^a	10	228 aAc	143 aAc	68 aAc	17 ^a Ac
CF2 ^a	10	146 bc	100 bc	39 bc	7 bc
BL1 ^a	10	154bc	110 bc	34 bc	10 bc
BL 2 ^a	10	158 bc	107 bc	42 c	9 bc

^TEl análisis estadístico se realizó utilizando la prueba no paramétrica de Chi Cuadrado, con p<0,01 prefijada. CF1=Ciclofosfamida administrada 48 y 24 h antes del sacrificio. CF2=Ciclofosfamida administrada 24 h antes del sacrificio. BL1=Bleomicina administrada 48 y 24 h antes del sacrificio. BL2=Bleomicina administrada 24 h antes del sacrificio. ^aAdministración por vía ip. Determinaciones en 2 000 EP/animal. Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo. (A) Resultados que difieren al comparar los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo. (c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo (CN).

El encontrar que solo la administración de la CF en dos ocasiones con intervalos de 24 h entre administraciones difiriera de forma significativa con los demás grupos, tanto en el índice de citotoxicidad como de genotoxicidad, se explica por ser este clastógeno químico un promutágeno. Así al administrar en dos ocasiones potencia su acción al aumentar el tiempo de exposición de las células de médula ósea a los metabolitos secundarios, siendo estos los de mayor efecto genotóxico (4,14).

A su vez los resultados obtenidos en este grupo experimental concuerdan con los hallados por nosotros al utilizar este mutágeno con el mismo esquema de administración al cual se hace alusión (8,15). Además, estos resultados están en conjunción con los hallados por nosotros y otros autores en estudios donde se utilizó la CF como mutágeno en ambos diseños, pero en la línea de ratón OF-1 (15,16).

Se encontró que la CF administrada en una sola ocasión no difirió en ambos sexos con los dos esquemas propuestos para la BL, ni tampoco hubo diferencias significativas entre estos dos últimos, al tenerse en cuenta la relación (EP/EN), el porcentaje de EP con micronúcleos y el número total de micronúcleos. Los resultados espontáneos e inducidos que se obtuvieron al administrar la CF en una sola ocasión 24 h antes del sacrificio, concuerdan con los valores reportados por Yiqiang y cols. en el 2005, en estudios donde se utilizó la línea Balb/c y otras (17).

Por otro lado, la diferencia significativa encontrada al comparar la CF, administrada en dos ocasiones con los dos tratamientos en los que se utilizó la BL, están dados por el mecanismo que opera cada uno de estos mutágenos, así como el nivel de especificidad y fidelidad de esta prueba para detectar el tipo de daño que inducen los clastógenos químicos como es el caso de la CF (1).

La CF logra formar monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas con la consecuente aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos, aumentando la aparición de retardos anafásicos en células somáticas, destacándose como un clastógeno químico de gran potencia (1,4). Este efecto mutagénico, al parecer, es capaz de detectarlo este ensayo con mayor grado de especificidad que el que induce la BL, el cual se encuentra mayormente vinculado a la inducción de labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro que produce radicales libres (2,18).

Al evaluar este biomodelo, con el mismo diseño experimental establecido en este ensayo pero con la técnica citogenética de aberraciones cromosómicas, se obtuvo igualmente como resultado que la CF, administrada en dos ocasiones, difirió con los otros tres tratamientos. Siendo este diseño el ideal para inducir un número considerable de aberraciones cromosómicas en ratones Balb/c de ambos sexos (19).

Al comparar las variables analizadas entre sexos no se observó diferencias significativas, teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad (EP/EN) y de genotoxicidad (% MN-EP). Estas variables se comportaron de forma similar en ambos sexos, tanto de forma espontánea como inducida por CF o BL en los diferentes tratamientos en que fueron utilizados estos mutágenos.

Los resultados de este estudio permiten utilizar la CF en dos administraciones como el mejor diseño para inducir retardos anafásicos en células somáticas de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos, útil en diseños experimentales de evaluación de drogas con efectos antígenotóxicos, demostrados mediante este biomodelo in vivo y como control positivo en las evaluaciones genotóxicas o mutagénicas de nuevos ingredientes activos, drogas, plaguicidas, vacunas, adyuvantes y otros (5, 6, 12, 20).

Obtuvimos como resultado una mayor inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y un mayor índice de citotoxicidad con el uso de la ciclofosfamida, administrada a ratones Balb/c en dos ocasiones antes del sacrificio, con intervalos de 24 h entre ambas administraciones. Esto constituye, bajo nuestras condiciones experimentales, el mejor diseño experimental para inducir un número considerable de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones, siendo útiles estos resultados para evaluar drogas con efecto antígenotóxico, además que presupone su uso como control positivo en estudios de mutagénesis o genotoxicidad.

Referencias

1. OECD. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, in bone marrow cells TG 474 (Annual Report 2009). Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions; 2009:7-123. Disponible en: <http://www.oecd.org/bookshop>
2. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substances (7101). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. United States Government Printing Office Editions. Health Effects Test Guidelines Washington: IRL Press; 1998.
3. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytotherapy Research* 2001;15:581-5.
4. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monografía Medicina Veterinaria 1999; 19(2):1-8.
5. Lóriga E, Alfonso B, Socorro M, Ortega J, Pomares Y. Evaluación genotóxica de la vacuna VA-MENGOC-BC® empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. *Anuario Toxicología* 2001;1(1):25-9.
6. Fraga JR, Domínguez Y, Friman M, González SB, Somoza AD, Pérez C. Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirosis

- vax-SPIRAL® empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. *Anuario Toxicología* 2001; 1(1):35-9.
7. Domínguez A, Tamayo M, Pérez I, Salas H, Pérez O, Batista A. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor* 2009;18(3):13-7.
 8. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel* 2009; 24(2):7-29.
 9. Arencibia DF, Rosario LA. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 2010; 27(1):1-8.
 10. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc; 1997.
 11. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, López Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb/c de ambos sexos. *Retel* 2009; 23(2):8-22.
 12. Díaz S, González I, González R, Coll F. Evaluación antigenotóxica *in vivo* de un análogo de brasinosteroides. *Revista Cubana de Farmacia* 2008; 42(Sup Esp 3):75-6.
 13. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 2009; 25(3):22-38.
 14. Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug resistance, and the feature. In: Hoffman R, et al eds. *Hematology: basic principles and practice*. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1995 p. 915-40.
 15. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. *Revista Cubana de Farmacia* 2009; 43(2):8-9.
 16. Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, García H. Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 2005;36 (Especial):14-8.
 17. Yiqiang L, Mengmeng Q, Liwei S, Yulin W, Yuangao CH. Genotoxicity study of phenol and o cresol using the micronucleus test and the comet assay. *Toxicol & Environmental Chemical* 2005;87(3):365-72.
 18. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2001; 20(1):48-53.
 19. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. Comparación de la Respuesta de Ratones Balb/c de Ambos Sexos a la Administración de dos Sustancias Mutagénicas mediante el Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en Células de la Médula. *Revista Argentina de Veterinaria* 2010;27(269):1-10.
 20. Matuo R, Oliveira RJ, Silva AF, Mantovani MS, Ribeiro LR. Anticlastogenic Activity of Aqueous Extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing Cells (HTCs) During Cell Cycle. *Toxicology Mechanisms Method* 2007; 17(3):147-52.

Biomodels for micronuclei induction on bone marrow cells by cyclophosphamide and bleomycin

Abstract

Balb/c mice of both sexes were evaluated as biomodel in the induction of micronuclei in bone marrow cells by cyclophosphamide and bleomycin. They were divided into five experimental groups per sex. The first one was administered with NaCl 0.9% by intraperitoneal (i.p) route, the second and third groups were administered with cyclophosphamide by i.p route, with designs of different treatments at doses of 50 mg/kg. The fourth and fifth groups were administered with bleomycin by i.p route, equally in two designs of different treatments at 20 mg/kg doses. This resulted in a higher micronuclei induction of polychromatic erythrocytes and in a higher cytotoxicity index with the use of cyclophosphamide administered twice before the sacrifice, with a 24-hours interval between administrations. According to our experimental conditions, this is the best design to induce a considerable number of micronuclei in bone marrow cells of mice, being useful in experimental designs to evaluate drugs with antigenotoxic effect. In addition, it implies its use according to the best found experimental design as positive control in mutagenesis and genotoxicity studies.

Keywords: Induction, micronuclei, Balb-C mice, cyclophosphamide, bleomycin.
