



DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TERATOGÉNICO DE DOS MARCAS DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A, EN RATONES NEONATOS MEDIANTE PRUEBA DE MICRONÚCLEOS.

María Luisa Ramos-Ibarra ^a, Carlos Mojica de León ^b, José Luis Zavala-Aguirre ^c, Olivia Torres-Bugarín ^c, Dalia Elizabeth Santos Orozco ^a y Laura Alejandra Hernández Barajas ^a.

^a Depto. Salud Pública, Div. Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara (UDG), ^b Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, ^c Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). maluisaramos@hotmail.com.

1. RESUMEN

Actualmente, la toxina botulínica (TBA) tiene una inmensa gama de aplicaciones clínicas en diversas ramas de la medicina. En 1989, la TBA fue aprobada por la FDA en USA, para el tratamiento del estrabismo, blefaroespasmos y espasmo hemifacial como manejo coadyuvante de la parálisis facial. En el 2002 se aprobó su uso para tratamiento estético y en hiperhidrosis axilar. Las marcas más utilizadas de toxina botulínica tipo A (TBA) son: Botox (TBAB), Dysport (TBAD) y Xeomeen (TBAX). Sin embargo, sólo se conocen los efectos potencialmente teratogénicos de TBAD. El objetivo del estudio fue determinar el potencial teratogénico de TBA en eritrocitos de ratones neonatos mediante prueba de micronúcleos. Metodología: se formaron tres grupos con ratonas preñadas que fueron las unidades de tratamiento. Grupo 1: se aplicó solución fisiológica; grupo 2: recibieron TBAB multiplicada por 10, Grupo 3: se les aplicó TBAX multiplicada por 10. Al nacer las crías (unidades/análisis), se les tomó muestra de sangre. Se realizaron frotis, se procesaron para su análisis con microscopía de fluorescencia y se contabilizaron los eritrocitos micronucleados (EMN) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) para evaluar genotoxicidad y la proporción de eritrocitos policromáticos (EPC) para evaluar citotoxicidad. Se empleó la prueba de ANOVA, *Kruskal-Wallis*, de *Levene* y rangos múltiples LSD 95%. Se utilizó un valor de $P < 0.05$. Resultados. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control, como se esperaba; sin embargo, cuando se realizó el análisis entre grupos, se encontró que los experimentales presentan diferencias significativas en los EMN; al presentar incremento de estos ($p=0.0038$) con respecto al control y una disminución en los valores de EPC ($p=0.021$); este evento, no permitió que se observaran los EPCMN. Conclusiones: el modelo del ratón resultó ser muy sensible para detectar efectos potencialmente teratogénicos o menos con estos fármacos. Ambas marcas de TBA produjeron efectos genotóxicos y citotóxicos en los ratones neonatos.

2. INTRODUCCIÓN

La toxina botulínica (TBA) es una exotoxina citoplasmática que se une a los receptores celulares específicos, penetrando por endocitosis en las terminaciones nerviosas incidiendo en una de las tres proteínas esenciales relacionadas con la liberación de los neurotransmisores sinápticos (la acetilcolina). El resultado final del proceso es la denervación a nivel de la placa neuromuscular, una atrofia muscular y parálisis flácida¹. La utilización clínica de la TBA, fue descrita por Scott y cols., en 1973, cuando realizaba una investigación de estrabismo en primates. Actualmente, tiene una inmensa gama de aplicaciones clínicas en diversas ramas de la medicina². En 1989, fue aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*; por sus siglas en inglés) en USA, para el



tratamiento del estrabismo, blefaroespasma y espasmo hemifacial como manejo coadyuvante de la parálisis facial^{3,4}. En el 2002 se aprobó su uso para tratamiento estético de las arrugas faciales y en hiperhidrosis axilar. Las marcas más utilizadas de TBA son: Botox (TBAB), Dysport (TBAD) y Xeomeen (TBAX). Sin embargo, solo se conocen los efectos potencialmente teratogénicos de TBAD en ratas por medio de la prueba de micronúcleos (MN)^{5,6}. Esta fue implementada por Schmid en 1975⁷ y hasta la fecha se ha realizado en diversos tejidos y diferentes especies para determinar el daño cromosómico *in vivo* ocasionado tanto por agentes clastogénicos como aneuploidogénicos⁸; específicamente esta prueba aplicada en sangre periférica ha resultado ser rápida, sencilla, confiable y económica, ya que no se requiere el sacrificio del organismo ni el cultivo celular^{9, 10}. Por otra parte, los MN son biomarcadores de efecto que se forman en metafase-anafase, son cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico o fragmentos de cromosomas sin centromero que no lograron incorporarse al núcleo de la célula hija⁹.

3. OBJETIVO

Determinar el potencial teratogénico de TBA (Botox: [TBAB] y Xeomeen: [TBAX]) en eritrocitos de ratones neonatos; mediante prueba de micronúcleos.

4. MATERIAL Y MÉTODO

Se formaron tres grupos con ratonas preñadas de 19 días de gestación que fueron las unidades de tratamiento (UT). Grupo 1: (Testigo negativo) se aplicó solución fisiológica; grupo 2: (Experimental 1) recibieron una dosis de 50 U (unidades; de TBAB multiplicada por 10, Grupo 3: (Experimental 2) se les aplicó 50 UTBAX multiplicada por 10. Al nacer las crías (unidades de análisis [UA]), se les tomó muestra de sangre periférica por corte de la punta de la cola. Se realizaron dos frotis por cada organismo, se tiñeron con naranja de acridina (tinción específica para ácidos nucleicos), se procesaron para su análisis con microscopía de fluorescencia y se contabilizaron los eritrocitos micronucleados (EMN/10,000 eritrocitos totales [ET]) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN/1,000 eritrocitos policromáticos [EPC]) para evaluar genotoxicidad y la proporción de EPC/1,000 ET para evaluar citotoxicidad (Fig. 1). Se empleó la prueba de ANOVA, *Kruskal Wallis*, de Levene y rangos múltiples LSD 95%; con valor de $P < 0.05$.

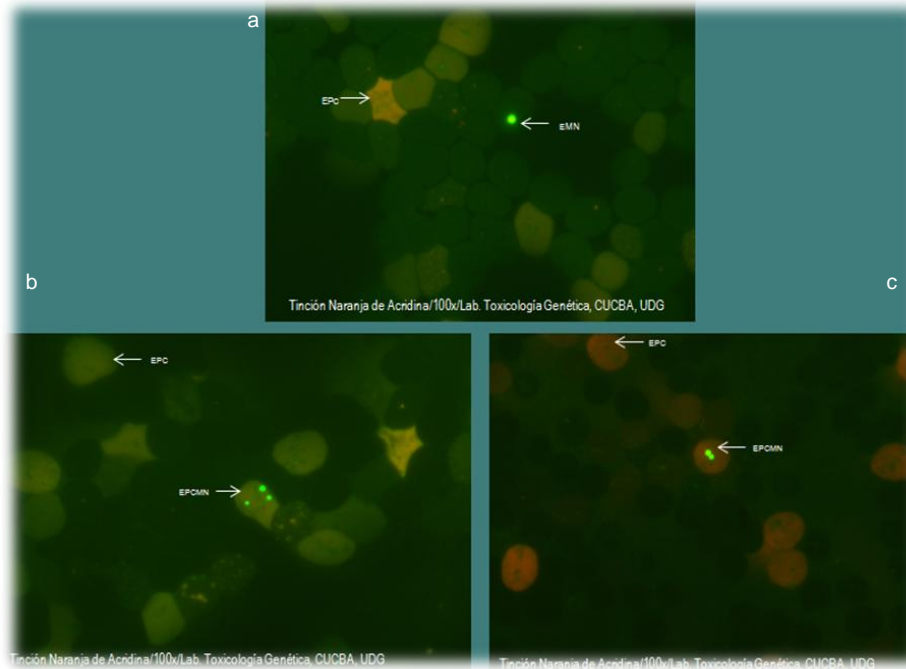


Figura 1. Frotis de sangre periférica de ratones neonatos: a) Grupo control; eritrocitos policromáticos (EPC; eritrocitos de color rojo) y eritrocitos micronucleados (EMN; eritrocitos de color verde brillante, mientras que el micronúcleo es de color amarillo) b y c) Grupos experimentales con TBAB y TBAX; eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN; eritrocitos de color naranja o rojos; los micronúcleos de color amarillo. En la fig. b se observa daño severo en el eritrocito.

5. RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control, como se esperaba; sin embargo, cuando se realizó el análisis entre grupos, se encontró que los experimentales presentan diferencias significativas en los EMN; al presentar incremento de estos ($p=0.0038$) con respecto al control y una disminución en los valores de EPC ($p=0.021$); este evento, no permitió que se observaran los EPCMN. (Cuadro I). Es importante mencionar que hubo dos ratonas gestantes que pertenecían al grupo experimental de TBAB y TBAX respectivamente; que abortaron y otra que parió una cría con malformación (Figura 2). Lo que indica que probablemente los productos de gestación en esta especie resultaron ser muy sensibles a los efectos adversos de las dos marcas de TBA en comparación con el modelo en rata ⁶.



Cuadro 1. Valores promedio \pm desviación estándar de eritrocitos micronucleados (EMN), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y EPC, en sangre periférica de ratones neonatos (unidad de análisis) para evaluar el potencial teratogénico de dos marcas de toxina botulínica tipo A.

Grupos de estudio	Toma de muestras de sangre periférica en ratones neonatos (UA)		
	Valores de EMN/10,000 ET	Valores de EPCMN/1,000 EPC	Valores de EPC/1,000 ET
Grupo 1: SF (Control: n=3 [UT]; n=20 UT)	15.55 \pm 2.99	5.51 \pm 1.45	245.27 \pm 26.51
Grupo 2: TBAB (Experimental 1: n= 2 [UT]; n=15 UA)	19.86 \pm 2.82 (p<0.05)	7.35 \pm 2.34	217.00 \pm 25.93
Grupo 3: TBAX (Experimental 2: n=2 [UT]; n=10 UA)	21.23 \pm 5.98 (P<0.05)	7.69 \pm 2.83	219.07 \pm 59.66 (p<0.05)

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar. n: tamaño de muestra; EMN: eritrocitos micronucleados; EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados; EPC: eritrocitos policromáticos. SF: solución fisiológica; TBAB: toxina botulínica (Botox); TBAX: toxina botulínica (Xeomeen); UT: unidad de tratamiento; UA: unidad de análisis. Se aplicó prueba de *Kruskal Wallis* cuando se realizó la comparación intra e intergrupar. Se utilizó un valor de significancia de p<0.05



Figura 2. Ratón neonato con algunas deformaciones, probablemente ocasionadas por el efecto de TBA aplicada a su progenitora.

6. CONCLUSIONES

Al parecer el modelo de ratón resultó ser muy sensible para detectar efectos potencialmente teratogénicos en comparación a la rata y que las dos marcas de TBA aplicadas casi al término de la gestación (día 18) a sus respectivas progenitoras, produjeron efectos genotóxicos y citotóxicos en los ratones neonatos.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Matarasso, Chia y el Plastic Surgery Educational Foundation DATA Committee. La toxina botulínica. Seguimiento. *Plast Reconstr Surg*; 114 (5S):73-77, 2004.
2. Dolly JO, Aoki KR. The structure and mode of action of different botulinum toxins. *European Journal of Neurology*. 2006; 13: 1-9.
3. Carruthers J, Carruthers A. The evolution of botulinum neurotoxin type A for cosmetic applications. *J Cosmet Laser Ther*. 2007; 9:186-193.
4. De Boule K, Fagien S, Sommer B, Glogau R. Trating glabellar lines with botulinum toxin type A-hemagglutinin complex: A review of the science, the clinical data, and patient satisfaction. *Clinical Interventions in Aging*. 2010;5:101-118
5. Hexsel C, Hexsel D, Porto MD, Schiling J, Siega C. Botulinum toxin type A for aging face and aesthetic uses. *Dermatology therapy*. 2011; 24:54-61.
6. Monge Miranda Hermes. Valoración genotóxica, citotóxica y potencial teratogénico de toxina botulínica (Dysport): Estudio comparativo en sangre periférica de ratón y ratas recién nacidas. Tesis de posgrado para obtener la especialidad en Cirugía Plástica Reconstructiva. Guadalajara, Jalisco. Febrero 2012.
7. Schmid, W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 1975; 31: 9-15.
8. Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, C., Gómez-Meda, B., Ramos-Ibarra, M., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D. & Gallegos-Arreola, M. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among Young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 494, 2001, pp. 161-166.
9. Torres-Bugarín, O. Ramos, I. M. L. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Int. J. Morphol.*, 31 (2):650-657, 2013.
10. Torres-Bugarín O, Ramos Ibarra ML. Micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa bucal para evaluar población en riesgo laboral por mutágenos. *Rev. Costarr Salud Pública*, 2013; 22: 1-3.