

NOTA CIENTÍFICA

Embriotoxicidad del bromato de potasio en ratón (*Mus musculus*)

Potassium bromate embryotoxicity in mouse (*Mus musculus*)

José M. Gonzales*, José L. Pino

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi

(* Dirección del autor a la que deben dirigirse las correspondencias: Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 11 0058, Lima 11, Perú.

Email José Gonzales: ppgonda@gmail.com

Presentado: 19/06/2006
Aceptado: 06/10/2006

Resumen

Se evaluó *in vivo* los efectos de bromato de potasio ($KBrO_3$) sobre el desarrollo de embriones preimplantacionales de ratón. Ratonas preñadas fueron tratadas con una dosis única de $KBrO_3$ (68,5 mg/kg de peso corporal; n= 8) y un grupo control (C) tratado con agua destilada (n= 7) en el día 1; al cuarto día de preñez, las hembras fueron sacrificadas, los embriones fueron extraídos de los oviductos y de los cuernos uterinos para la evaluación. El $KBrO_3$ produjo un retraso en el desarrollo embrionario, encontrándose un 76,9±7,8 y 11,2±5,5 en porcentaje de blastocistos y mórulas respectivamente en el C en comparación de un 34,8±11,2 y 49,3±11,9 de la misma relación en el grupo tratado, mostrando diferencias significativas ($p<0,05$). En cuanto a la calidad embrionaria, se observó un incremento en el porcentaje de embriones de baja calidad (grado III y degenerados) en el grupo tratado, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p>0,05$). En conclusión podemos decir que el $KBrO_3$ produce un efecto dañino sobre el embrión, causando retraso en su desarrollo.

Palabras clave: Bromato de potasio, preimplantacional, ROS, embriotoxicidad, ratón.

Abstract

The effect of potassium bromate ($KBrO_3$) on preimplantation mouse embryo development was evaluated *in vivo*. Pregnant mice were treated with unique dose of $KBrO_3$ (68,5 mg/kg of corporal weight; n= 8) and a control (C) provided with distilled water (n= 7) on day 1; at the fourth day of pregnancy, females were sacrificed, embryos were flushed from oviducts and uterine horns for evaluation. $KBrO_3$ causes a delay in the embryonic development, 76,9±7,8 y 11,2±5,5 percent of blastocyst and morulae respectively in the control group comparing with 34,8±11,2 y 49,3±11,9 percent of the same relation in the treated group, showing significant difference ($p<0,05$). Concerning to the embryonic quality, an increase in the percentage of low quality embryos (degree III and degenerated) in the treated group is observed, but this difference is not statistically significant ($p>0,05$). In conclusion we can say that $KBrO_3$ produces a harmful effect on the embryo causing a delay on its development.

Keywords: Potassium bromate, preimplantational, ROS, embryotoxicity, mouse.

Introducción

El bromato de potasio ($KBrO_3$) es empleado para aumentar y mejorar la consistencia de la masa de pan y pasteles, favoreciendo así su presentación y reduciendo el costo del consumo de energía en la cocción.

Desde 1992, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y Alimentación (FAO) consideran al bromato de potasio como sustancia nociva para los humanos, debido a que su ingestión prolongada puede causar vómitos, diarreas, metahemoglobinemia y daños renales; además, tiene efectos mutagénicos, destruye la vitamina B_1 e inhibe la disponibilidad del hierro y degrada el ácido fólico (Budavari et al., 1989). De igual forma, la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer reconoció que su consumo incrementa los riesgos de contraer cáncer (IARC, 1986).

Se sabe que el $KBrO_3$ produce daño oxidativo al ADN (Speit et al., 1999; O'Donoghue et al., 1999), lo cual se verifica con el incremento de la frecuencia de micronúcleos (MN) en células de la médula ósea de ratón, cuando es administrado ya sea por vía oral o intraperitoneal (Hayashi et al., 1988; 1989). Se conocen sus propiedades citotóxicas, mutagénicas y genotóxicas, por su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS)

produciendo peroxidación lipídica y daños al ADN, además se reportó daños al riñón en donde también se evidenció su propiedad carcinogénica. (U.S. EPA, 2001).

No existen reportes concluyentes del efecto del $KBrO_3$ a nivel reproductivo y menos a nivel de diferenciación temprana (Kurokawa et al., 1990).

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto tóxico de $KBrO_3$ sobre el desarrollo de embriones preimplantacionales de ratón.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembras vírgenes de la cepa Albino Swiss Rockefeller entre 7 – 10 semanas de edad, mantenidos en condiciones estándar de bioterio con un fotoperíodo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad y con una temperatura ambiente entre 22-24 °C, mantenidos con alimento balanceado (Purina, Perú) y agua *ad libitum*.

Químicos

Bromato de potasio ($KBrO_3$) (Baker CAS: 7758-01-2), Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,2 (Sigma).

Diseño experimental

Ratonas en etapa de estro o proestro, fueron cruzadas con un macho semental toda la noche y la presencia del tapón vaginal al día siguiente fue señal de que ocurrió la cópula y fue tomado como día 1 (D1) de la preñez.

A las ratonas preñadas se les administró intraperitonealmente (ip), una dosis única de KBrO_3 (68,5 mg/kg de peso corporal (pc); $n=8$) y al grupo control (C) se los trató (ip) sólo con agua destilada ($n=7$) en D1; al cuarto día (D4) post cópula; las ratonas fueron pesadas y posteriormente sacrificadas por dislocación cervical, se procedió a extraer los ovarios (para el conteo de cuerpos lúteos), los oviductos y útero (para la obtención de los embriones mediante un lavado con una solución de PBS (pH 7,4)).

Para la evaluación morfológica de los embriones, tanto en estadio del desarrollo como en la de gradación de la calidad embrionaria, se consideraron los criterios de Dorn & Kraemer (1987) y Baczkowski et al. (2004), que usan un sistema de 3 grados con categorías numéricas que van de alta calidad a una mas baja (grado I–III) y una categoría degenerado; el sistema de gradación de embriones indica si los embriones tienen el potencial para continuar su desarrollo. Este sistema toma en cuenta el correcto clivaje de los blastómeros (que deben ser de igual tamaño y no extruídos de la masa embrionaria compacta), además de la ausencia o presencia de fragmentaciones citoplasmáticas.

Estadística

Los datos paramétricos fueron analizados por ANOVA y los no paramétricos por la prueba de Kruskal-Wallis y los resultados corroborados por Bonferroni, t-test y Mann-Whitney U-test respectivamente. Un nivel de probabilidad menor del 5% fue considerado significativo.

Resultados

No hubo muerte materna durante el experimento; los parámetros materno y reproductivo fueron similares entre C y el grupo tratado (Tabla 1). En el desarrollo embrionario, se observó una diferencia significativa ($p<0,05$) en el porcentaje de mórulas y blastocistos del grupo tratado en comparación con C (Tabla 2). En la Tabla 3, se presenta la evaluación de la calidad embrionaria, mostrándose un incremento en el porcentaje de embriones de baja calidad (grado III y degenerados) en el grupo tratado, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p>0,05$).

Tabla 1. Parámetros maternos y reproductivos en C y el grupo tratado con Bromato de potasio.

	Control (H_2O)	KBrO_3 (68,5 mg/kg/pc)
Hembras preñadas	7	8
Peso maternal (media \pm SE)		
Día 1	30,2 \pm 1,5	28,3 \pm 1,3
Día 4	29,7 \pm 1,7	26,2 \pm 1,3
Diferencia de pesos (media \pm SE)		
Día 1 - 4	0,6 \pm 0,4	2,1 \pm 0,7
Nº embriones (media \pm SE)	10,6 \pm 0,6	10,3 \pm 1,1
Nº cuerpos lúteos (media \pm SE)	11,4 \pm 0,7	10,7 \pm 1,1

Control vs. tratado * $P<0,05$ ANOVA test y Bonferroni t-test.
SE. error estandar de la media

Tabla 2. Comparación de porcentajes de los estadios embrionarios entre C y el grupo tratado.

	Control (H_2O)	KBrO_3 (68,5 mg/kg/pc)
Nº embriones	74	82
Porcentaje de embriones en:		
2 a 8 células (media \pm SE)	6,7 \pm 4,5	12,2 \pm 5,9
Mórula (media \pm SE)	11,2 \pm 5,5	49,3 \pm 11,9*
Blastocisto (media \pm SE)	76,9 \pm 7,8	34,8 \pm 11,2*
No determinado (media \pm SE)	5,2 \pm 2,7	3,8 \pm 3,7

Control vs. tratado * $P<0,05$ Kruskal-Wallis test y Mann-Whitney U-test.
SE. error estandar de la media.

Discusión

Para probar si un compuesto xenobiótico tiene propiedades embrióticas o afecta el desarrollo del embrión, debemos usar dosis que no produzcan efectos tóxicos a la madre. En nuestro estudio la dosis suministrada no mostró evidencia de toxicidad materna (Tabla 1).

Austin (1973) y Sadler & Langman (1993) consideran que el embrión durante el periodo preimplantacional cumple la regla de “todo o nada”, esto es debido a la totipotencialidad que mantiene cada blastómero; es decir, si una es dañada esta va a ser reemplazada o si son muchas entonces el embrión no continúa su desarrollo. Sin embargo, considerando que aproximadamente el 70% de los defectos congénitos son de etiología desconocida, existe ahora evidencia que la exposición durante la etapa de preorganogénesis a ciertos agentes puede conducir a anomalías fetales como un resultado del daño directo al embrión temprano expuesto (Kimmel et al., 1993). Antes del estado de mórula, los blastómeros individuales del embrión no se encuentran compactados; consecuentemente, todos están expuestos al ambiente externo en igual grado, pudiendo considerarse a cada blastómero como una entidad independiente por la ausencia de mecanismos regulatorios presentes en un tejido multicelular (Gutierrez-Pajarez, 2000).

En este trabajo la exposición de los embriones al KBrO_3 fue precisamente en un estado anterior a la formación de la mórula, con la intención de evaluar el posible efecto tóxico de éste compuesto en un estadio temprano de segmentación.

Tabla 3. Comparación de porcentajes de calidad embrionaria entre C y el grupo tratado.

	Control (H_2O)	KBrO_3 (68,5 mg/kg/pc)
Nº embriones	74	82
Porcentaje de Embriones con:		
Grado I (media \pm SE)	26,6 \pm 11,5	12,7 \pm 4,3
Grado II (media \pm SE)	62,0 \pm 12,1	33,8 \pm 8,2
Grado III (media \pm SE)	4,4 \pm 2,1	29,6 \pm 12,2
Degenerado (media \pm SE)	7,0 \pm 2,7	23,5 \pm 11,7

Control vs. tratado * $P<0,05$ Kruskal-Wallis test y Mann-Whitney U-test.
SE. error estandar de la media.

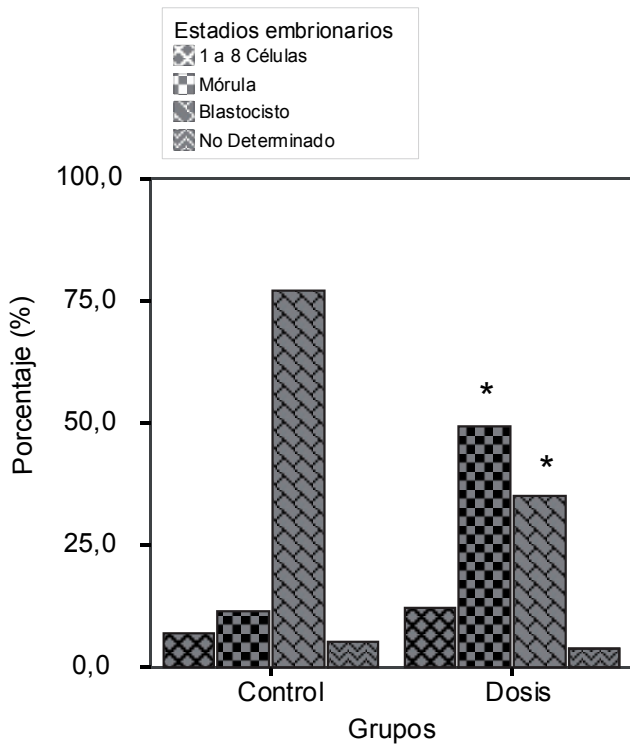


Figura 1. Porcentaje de embriones obtenidos en los diferentes estadios en los grupos control y tratado (* p<0,05; Kruskal-Wallis test y Mann-Whitney U-test.)

En los resultados de la Tabla 2, se observa que KBrO₃ produjo un retraso en el desarrollo embrionario, disminuyendo el porcentaje de blastocistos en un 42,1% y aumentando el de mórulas en un 38,1% en el grupo tratado en comparación con C, diferencias

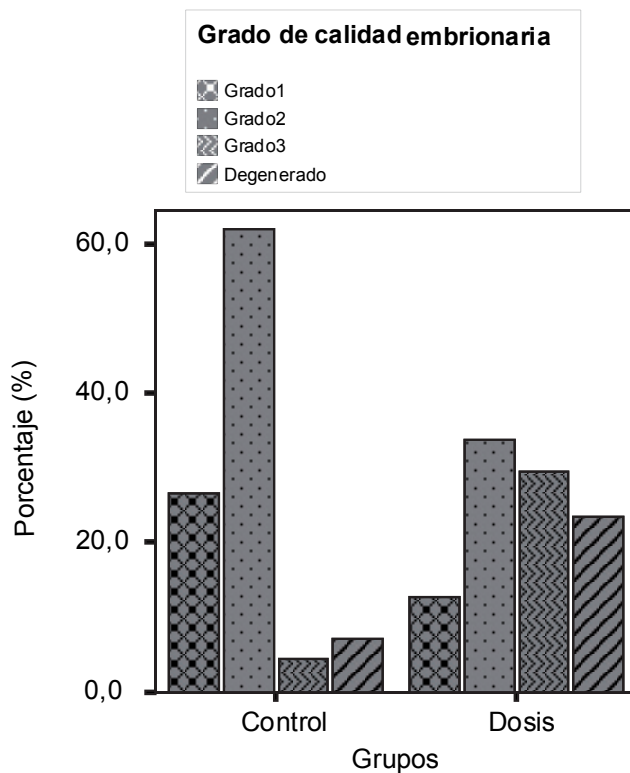


Figura 2. Porcentaje de embriones obtenidos de acuerdo al grado de calidad embrionaria en los grupos control y tratado (* p<0,05;

que fueron estadísticamente significativas (p<0,05), evidenciando un efecto sobre el normal desarrollo del embrión (Fig 1).

Para que una división celular ocurra, antes debe haber concluido una correcta replicación del ADN, si no se completa esta replicación, entonces no se da la citocinesis; por otra parte se sabe que KBrO₃ causa quiebres de los filamentos de ADN, daños oxidativos en las bases del ADN (O'Donoghue et al., 1999), aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (Speit et al., 1999); es probable que estos efectos, activen los mecanismos de reparación intrínsecos a la replicación, lo que conllevaría a un retraso en el inicio de la citocinesis; esto explicaría el resultado encontrado en nuestro trabajo.

En la Figura 2 y Tabla 3 se observa un incremento en el porcentaje de embriones de baja calidad (grado III y degenerados) (p>0,05); en el grupo tratado con KBrO₃, demostrándose una alteración de la calidad embrionaria en base al criterio morfológico; probablemente, la capacidad del compuesto de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) induciendo peroxidación lipídica y daños al ADN (U.S. EPA, 2001), influenció en el daño celular incrementando la frecuencia de embriones de baja calidad que tendrían poca posibilidad de continuar su desarrollo.

En conclusion podemos decir que el KBrO₃ produce un efecto dañino sobre el embrión causando un retraso en su desarrollo.

Litertaura citada

Austin C. R. 1973. Embryo transfer and sensitivity to teratogens. *Nature* 244 (5415):333-334.

Baczkowski T., R. Kurzawa, W. Glabowski. 2004. Methods of embryos scoring in in vitro fertilization. *Reprod. Biol.* 4: 5-20.

Budavari S., M.J. O'neil, A. Smith, P.E. Heckelman. 1989. *The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, drugs and Biologicals.* 11th ed. Rahway, NJ: Merck and Company, Inc.

Dorn C.G., D.C. Kraemer, editors. 1987. *Bovine embryo grading.* Texas: Texas A & M University.

Hayashi M; M. Kishi, T. Sofuni, et al. 1988. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem Toxicol* 26: 487-500.

Hayashi M., S. Sutou, H. Shimada, et al. 1989. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: the 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS-HMS. *Mutat Res* 223: 329-344.

Gutiérrez-Pajares J. 2000. Efecto del Malathion, plaguicida organofosforado, sobre el desarrollo embrionario preimplantacional del ratón. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 101 pp.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1986. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. Lyon, (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 73: 481- 496.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 859. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_p116.htm acceso: 19/06/2006

Kimmel C.A., W.M. Generoso, R.D. Thomas & K.S. Bakshi. 1993. A new frontier in understanding the mechanisms of developmental abnormalities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119: 159-165.

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>

- Kurokawa Y., A. Maekawa, M. Takahashi & Y. Hayashi. 1990. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate - A new renal carcinogen. *Environ. Health Perspect.* 87: 309-335.
- O'Donoghue J., E.D. Barber, T. Hill, J. Aebi, L. Fiorica. 1999. Hydroquinone: Genotoxicity and Prevention of Genotoxicity Following Ingestion. *Food Chem. Toxicol.* 37: 931-936.
- Sadler T., J. Langman. 1993. *Embriología Médica*. Editorial Médica Panamericana. México. 414 pp.
- Speit G., S. Haupter, P. Schütz, P. Kreis. 1999. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.* 439: 213-221.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2001 Toxicological Review of Bromate EPA/635/R-01/002.