

Genotoxicidad de un tipo de acrilamida derivada de la hidrólisis del cianoacrilato de n-butilo

Genotoxicity of a type of acrylamide derived from the hydrolysis of n-butyl cyanoacrylate

MSc. María Elena Cañizares Graupera,^I Dra. C. Bárbara González Navarro,^{II} Dra. C. María Antonia Torres Alemán^{III}

^I Facultad de Ingeniería Química, Instituto Politécnico Superior José Antonio Echeverría (IPSJAE). La Habana, Cuba.

^{II} Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). La Habana, Cuba.

^{III} Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: los cianoacrilatos de alquilo son monómeros acrílicos de amplio uso como adhesivos. Recientemente se demostró mediante procedimientos químicos que el cianoacrilato de n-butilo se hidroliza a un tipo específico de acrilamida cuando contacta los tejidos. La estructura que se identificó justifica la formación de enlaces iónicos o covalente con las estructuras biológicas y la absorción del compuesto por los tejidos.

Objetivo: comprobar la genotoxicidad del cianoacrilato de n-butilo.

Métodos: se realizó una prueba de genotoxicidad vía dérmica por micronúcleos en el fémur de 30 ratones NMRI, a la dosis límite de 2 000 mg/kg utilizando como control positivo la acrilamida, y los animales sin tratamiento como control negativo.

Resultados: la prueba fue positiva a las 48 h y confirmó el daño al material genético como una consecuencia de la estructura de la molécula.

Conclusiones: la genotoxicidad comprobada del tipo de acrilamida derivada de la hidrólisis del cianoacrilato de n-butilo puede repercutir sobre los criterios

medioambientales establecidos para el uso de pegamentos y otras sustancias que contengan este compuesto.

Palabras clave: cianoacrilatos, acrilamida, micronúcleos, genotoxicidad.

ABSTRACT

Introduction: alkyl cyanoacrylates are acrylic monomers highly used as adhesives. Recently it has been demonstrated by chemical methods that n-butyl cyanoacrylate is hydrolyzed to a specific acryl amide when it is in contact with tissues. The identified structure accounts for the formation of ionic and covalent bonds with the biological structure as well as the absorption of the product by tissues.

Objective: to determine the genotoxicity of n butyl cyanoacrylate.

Methods: a micronuclei test was conducted by dermal route in the femur of 30 NMRI mice at a limit dose of 2 000 mg/kg using acrylamide as positive control and the non treated animals as negative control.

Results: the test was positive after 48 hours and confirmed the damage to the genetic material as a consequence of its chemical structure.

Conclusions: the corroborated genotoxicity of the acrylamide type as a consequence of the hydrolysis of n butyl cyanoacrylate could have repercussions over environmental criteria established for the use of glues and other substances containing this compound.

Key words: cyanoacrilates, acrylamide, micronucleous, genotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Los cianoacrilatos de alquilo son monómeros acrílicos líquidos, de volatilidad intermedia y de alta adhesividad a diferentes sustratos. Recientemente se demostró mediante procedimientos químicos que estos monómeros se hidrolizan a un tipo específico de acrilamida cuando contactan aminoácidos.¹ La nueva estructura es un tipo específico de acrilamida no estudiada con anterioridad. En aquella ocasión se nombró como CABH, y posee grupos funcionales como el grupo amida y grupo carboxilo que pueden interactuar con el organismo vivo en una relación de amino complejo y el grupo vinilo que puede formar enlaces covalentes, aspectos que se analizaron en detalle con anterioridad² y que inducen a pensar en una estructura muy tóxica.

Este nuevo punto de vista con relación al cianoacrilato de n-butilo (CAB) cambia el criterio de toxicidad manejado con anterioridad para este compuesto, atribuida fundamentalmente a la liberación de formaldehído en los tejidos,^{3,4} o liberación de formaldehído mediada por la degradación enzimática.⁵ En el ámbito nacional, es muy

importante esclarecer cualquier manifestación tóxica que ponga en riesgo la salud ocupacional para poder garantizar las medidas higiénico-sanitarias apropiadas.

El objetivo del presente trabajo es comprobar la genotoxicidad del cianoacrilato de n-butilo.

MÉTODOS

El CAB utilizado se obtuvo por el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana (BIOMAT), de entre 97-99 % de pureza, con inhibidor de hidroquinona 0,1-0,3 % y estabilizado con ácido p-toluensulfónico 0,1-0,3 %. La acrilamida que se utilizó como control positivo fue adquirida a la firma comercial Merck, alemana, calidad pura para análisis (p.a.).

La metodología que se aplicó en un experimento *in vivo* es confiable y aceptada internacionalmente.⁶ La prueba se desarrolló por la vía dérmica, porque son esta y la inhalatoria las de mayor riesgo para los trabajadores expuestos. En el ensayo se usó la dosis límite de 2 000 mg/kg, porque es la dosis más baja indicada por la norma aplicada⁷ cuando se trabaja con compuestos poco estudiados, como es el caso.

Para realizar las pruebas *in vivo* se tuvieron en cuenta las regulaciones vigentes,⁷ incorporadas en el código de ética de la institución donde se desarrollaron los experimentos y fueron aprobados por el Comité de Ética interno. Los ensayos que se llevaron a la práctica fueron previamente validados y se aplicaron las buenas prácticas de laboratorio.

Se utilizaron 30 ratones NMRI de ambos sexos, de siete semanas, procedentes del área de convencionales del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) con su certificado de calidad. La masa corporal se obtuvo mediante una balanza técnica Sartorius modelo PT-1 200. Esta fue de $24,8 \pm 2,2$ g para las hembras y $33,0 \pm 1,4$ g para los machos.

Previo al estudio, los animales se mantuvieron durante siete días, para la adaptación a las condiciones del vivario. Se utilizaron seis cajas de policarbonato (Tecniplast) tipo T2, con cinco ratones cada una, separados por sexo y tipo de tratamiento, sin encamado y bajo el control automático de la temperatura ambiental 22 ± 2 °C, humedad 60-70 %, y ciclo de luz/oscuridad 12/12 h. El agua se ofreció en biberones de policarbonato de 500 mL con pipeta de acero inoxidable. Tanto el agua como los alimentos (EMO 1002 ALYco®, CENPALAB) fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave y se ofrecieron a libre demanda, excepto durante los períodos de manipulación. Al inicio de la prueba, los animales se pesaron nuevamente. Luego de comprobar que los animales cumplían con la masa requerida, se distribuyeron de forma aleatoria entre los tres grupos y se tomó este valor como la masa a tiempo cero.

Los animales se identificaron individualmente, se rasuraron en la región escapular 24 h previas al experimento. Los grupos experimentales estuvieron conformados por diez animales cada uno (cinco de cada sexo por grupo). La distribución fue la siguiente: un grupo control negativo sin tratamiento, un control positivo tratado con una disolución acuosa de acrilamida a la dosis de 80 mg/kg de masa corporal. Esta dosis fue evaluada

con anterioridad en una prueba aparte para garantizar la biodisponibilidad del control positivo en la médula ósea cuando se utiliza la vía dérmica. El tercer grupo se trató con CAB puro, sin diluyente.

Se aplicó la dosis límite de 2 000 mg/kg dividida en dos aplicaciones separadas por 24 h, directamente sobre la piel rasurada, en un área de 1 cm² en la región escapular y se distribuyó en un filme fino. Previo a la segunda aplicación, los animales se pesaron de nuevo para verificar la dosis. El período total de exposición fue de 48 h. El ensayo terminó con el 100 % de sobrevida. Finalizado ese tiempo los animales se pesaron de nuevo y se sacrificaron por dislocación cervical. Se cortaron ambos fémures de cada animal y se extrajo la médula ósea. La cavidad medular se lavó con 1 mL de suero bovino fetal (SBF) mediante agujas de 27 G. El contenido medular se depositó en tubos Eppendorf[®] de 2 mL y se centrifugó a 1 000 rpm durante 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se suspendió de nuevo el botón celular en SBF. Las láminas se codificaron y se prepararon por duplicado. Se utilizaron 20 µL de cada muestra medidos con micropipeta. Se secaron al aire y se fijaron las estructuras celulares con metanol durante cinco minutos.

A las 24 h las láminas se colorearon con disolución Giemsa al 5 % y se lavaron con agua de la pila durante 15 min. Se describieron en el microscopio de luz por el mismo patólogo, utilizando un microscopio Olympus modelo CH-2 con el lente de inmersión de 100x.

Como la prueba duró solo 48 h, se registró el número de micronúcleos que estaban presentes en los eritrocitos policromáticos de cada 1 000 en cada lámina y de 2 000 por animal.

Como el interés de monitorear los micronúcleos en el estudio fue establecer la variación entre los grupos en tratamiento, se calculó la varianza para cada grupo. Entonces se calculó la media y la desviación estándar, se comparó entre los tres grupos y se aplicó la prueba de los rangos de Duncan.

RESULTADOS

Al finalizar la prueba no se encontraron evidencias estadísticas de cambios en la masa corporal entre los diferentes grupos de experimentación. Sin embargo, es conveniente destacar la tendencia entre los ratones hembras tratadas con CAB y de todos los ratones tratados con acrilamida a disminuir la masa corporal, mientras que los machos tratados con CAB presentaron un comportamiento similar al control negativo ([tabla 1](#)).

Las manifestaciones clínicas que se observaron fueron iguales a 24 y 48 h. Se evidenció dolor a la palpación en las hembras tratadas con CAB y piloerección en los machos.

En cuanto a las láminas preparadas para evaluar la presencia de micronúcleos correspondientes a los animales tratados con CAB, la característica más trascendente fue que se observaron muy pocas células jóvenes en el frotis. Se observó una tendencia generalizada al aumento de micronúcleos, tanto en los animales tratados con acrilamida como en los tratados con CAB. El aumento fue estadísticamente

significativo en el caso de las hembras. El valor medio y la desviación estándar se pueden ver en la [tabla 2](#). El resultado confirmó la genotoxicidad positiva de ambos compuestos.

DISCUSIÓN

En el ensayo que se llevó a cabo, se pudo comprobar la genotoxicidad positiva para el compuesto en estudio, como consecuencia de la hidrólisis que tiene lugar, con lo que se logró llevar a feliz término el objetivo planteado. Se pusieron de manifiesto dos resultados importantes: la tendencia a la disminución de la masa corporal entre las hembras y la incidencia de micronúcleos en el fémur de los animales tratados. El ensayo de genotoxicidad que se efectuó es recomendado por la OECD,⁶ lo que sustenta los resultados. Por otra parte, la estructura química del derivado que se obtiene como consecuencia de la hidrólisis del CAB por los tejidos¹ justifica este comportamiento. Se trata de una estructura de baja masa molecular y anfifílica (soluble en agua y lípidos), aspectos que facilitan la absorción a través de las membranas (barreras naturales que impone el organismo), y que se explicó con anterioridad.²

Hasta el presente, el criterio para explicar la toxicidad de los cianoacrilatos que aparece descrito en la literatura se asociaba a la liberación de formaldehído en los tejidos^{3,4} o mediado por la acción enzimática,⁵ pero no se encontró ningún trabajo que se desarrollara en medios biológicos o sobre la piel.

Si se parte del criterio del formaldehído, se justifica la determinación tomada para confeccionar adhesivos quirúrgicos a base de un monómero de mayor masa molar, CAB. El formaldehído representa una fracción másica menor en las moléculas de mayor masa molecular. El error estuvo en no comprobar si efectivamente estaba presente el formaldehído en los tejidos por los métodos convencionales del análisis químico. El aspecto químico de la identificación del metabolito^{1,2} fue crucial, ya que se demostró la presencia de un compuesto sobre los tejidos que es novedoso y no se ha estudiado la toxicidad con anterioridad, lo que cambia los criterios actuales y requiere de mayor documentación.

Por otra parte, la evaluación de la genotoxicidad aplicando la prueba de Ames descrita por otros autores,^{8,9} dieron como resultado menor toxicidad para el CAB que para los monómeros de menor masa molar. Estos ensayos evalúan el daño a las membranas celulares. Los compuestos de menor masa molecular son menos penetrables a través de las membranas, porque tienen menor componente lipofílico que el CAB, lo que justifica los resultados descritos por los autores. Esto explica que causen mayor daño local a nivel de la membrana, debido a que prepondera el efecto por la presencia del grupo vinilo, como alquilante, pero tienen menor probabilidad de que se absorban al interior y causen menor daño al material genético.

Por otra parte, los ensayos de genotoxicidad tienen la característica de ser muy específicos. Es por esta razón que se recomienda que se efectúe en una batería de ensayos a tres niveles, que involucren daños a las membranas, al gen y al cromosoma, máxime si alguno de estos ensayos es positivo. En el caso que nos ocupa, los resultados indican que debe profundizarse sobre este aspecto, pero con la certeza de encontrarse frente a un compuesto que es genotóxico.

Como consecuencia de los resultados que se obtuvieron en el ensayo actual, se recomienda efectuar la batería de ensayos de genotoxicidad completa establecida, que evalúe todos los niveles de riesgo, y de forma comparativa entre los monómeros de uso más común para la elaboración de materiales que se difunden en el mercado. Estos son, el cianoacrilato de metilo, el cianoacrilato de etilo y el CAB.

Independientemente de la confusión que se crea al no analizar las estructuras químicas que se liberan sobre los tejidos por los métodos convencionales, y asumir que es el formaldehído, no se explica cómo es posible que los monómeros de cadena corta, con resultados positivos de genotoxicidad en la prueba de Ames^{8,9} se utilicen desde los años 50 y hasta la actualidad para confeccionar adhesivos como la cola loca, que se difunde ampliamente en el mercado. Sin embargo, existe el consenso en relación a los estudios de genotoxicidad de que un resultado positivo en células procariotas es prácticamente extensivo a células eucariotas con muy poco margen de error.

Ninguno de estos adhesivos que se comercializan en la actualidad tiene indicado algún rótulo que aclare que el componente principal es genotóxico, que no se puede usar para pegar recipientes que contendrán alimentos, o por los niños para pegar sus juguetes, o los riesgos que corre un obrero que su función diaria durante 8 h sea pegar dispositivos con esos adhesivos, por citar solo algunos ejemplos.

En conclusión, la genotoxicidad comprobada del tipo de acrilamida derivada de la hidrólisis del CAB puede repercutir sobre los criterios medioambientales establecidos para el uso de pegamentos y otras sustancias que contengan este compuesto.

AGRADECIMIENTOS

Otros investigadores que se incluyen en el presente proyecto fueron la técnica Albertina Thomas Bellido de Luna y el colectivo de trabajadores del Centro de Toxicología Experimental (CETEX) del CENPALAB, que hicieron posible los ensayos biológicos con su esfuerzo personal y con el financiamiento. Apreciamos las importantes sugerencias proporcionadas por el doctor Manuel Álvarez Prieto, investigador del Instituto de Materiales y Reactivos (IMRE) de Universidad de La Habana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cañizares ME, Mocelo R, Riumont J. Nueva visión del proceso de iniciación de la polimerización de los 2-ciano-aceilatos de alquilo. Rev Iberoamericana de Polímeros. 2010;1(1):17-25.
2. Cañizares ME. Análisis de la relación estructura-actividad biológica desde una óptica química. Rev Iberoamericana Polímeros. 2010;11(4):200-7.
3. Leonard F, Kulkarni RK, Brandes G, Nelson J, Cameron JJ. Synthesis and degradation of poly (alkyl cyanoacrylates). J Applied Polymer Sci. 1966;10:259-72.

4. Lundberg P. Scientific basis for Swedish Occupational Standards XVIII. Criteria Group for Occupational Standards National Institute for Working Life Solna. Sweden. 1997;25:17-27.
5. O'Sullivan C, Birkishav C. Hydrolysis of poly n-butylcyanoacrylate nanoparticles using esterase. Pol Deg Stability. 2002;78:7-15.
6. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals 474, Mammalian erythrocyte micronucleus test. Adopted 21 July 1997. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/.../test-no-474-mammalia>
7. International of Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 2. ISO-10993-2 Animal Welfare Requirements. Adopted 2006. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber
8. Cary R. Methyl cyanoacrylate and ethyl cyanoacrylate. Geneve: World Health Organization; 2001. Concise International Chemical Assessment, 36.
9. The Registry of Toxic Effects of Chemicals Substances. Acrylic acid, 2-cyano-, methylester. RTECS No. 7000000, cas no. 137-05-3. Available from: <http://www.microkat.gr/.../Methyl%20cyanoacrylate.ht>

Recibido: 7 de junio de 2012.

Aprobado: 16 de julio de 2012.

María Elena Cañizares Graupera. Facultad de Ingeniería Química, Instituto Politécnico Superior José Antonio Echeverría (IPSJAE). Ave. 127 y Carretera Central Manuel Martínez Prieto, Marianao. La Habana, Cuba. Correo electrónico: mariaecg@quimica.cujae.edu.cu

Tabla 1. Valor medio y desviación estándar de la masa corporal de los ratones NMRI para cada grupo separados por sexo a tiempo cero, 24 h y 48 h

Grupo	Hembras				Machos			
	T= 0	T= 24	T= 48	p	T= 0	T= 24	T= 48	p
-	25,6 ± 3	26,3 ± 2	26,3 ± 2	0,5	32,5 ± 4	33,0 ± 4	32,0 ± 4	0,9
+	24,8 ± 2	24,6 ± 2	23,8 ± 2	0,7	33,0 ± 1	33,4 ± 2	32,4 ± 5	0,12
CAB	23,7 ± 3	23,9 ± 3	23,1 ± 3	0,9	33,3 ± 3	33,5 ± 3	33,1 ± 4	0,97
Rango	1=2=3	1=2=3	1≠3		1=2=3	1=2=3	1=2=3	-

n= 5 para cada grupo, $\alpha = 0,05$ y $p < 0,05$; donde (-): control negativo, (+): control positivo y CAB: animales tratados con el monómero, T: tiempo en horas y p: probabilidad estadística.

El rango indica el resultado del ensayo estadístico aplicado.

[Regresar](#)

Tabla 2. Datos generales de las láminas de micronúcleos de la médula ósea en ratones NMRI separados por sexo

Grupo	Hembras		Machos	
	MN	MN/PC x 100	MN	MN/PC x 100
-	11 ± 3	0,5 ± 0,2	13 ± 3	0,6 ± 0,2
+	25 ± 4	1,26 ± 0,8	21 ± 14	0,9 ± 0,8
CAB	21 ± 4	1,3 ± 0,2	22 ± 9	1,1 ± 0,4
p	0,002	0,03	0,33	0,4
Rango	1≠2, 1≠3,2≠3	1≠2,1≠3,2≠3	1=2=3	1=2=3

n= 5 para cada grupo; α = 0,05 y $p < 0,05$; donde (-): control negativo, (+): control positivo y (CAB): animales tratados con el monómero, MN: frecuencia de aparición de micronúcleos y MN/P x 100: porcentaje de genotoxicidad.

[Regresar](#)