

El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*1}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2}.**

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

**Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Teléfono: 057(07)2716911. Email:

darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia espontánea e inducida de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética en el biomodelo a utilizar, para de esta forma darnos cuenta que estamos frente a una sustancia mutagénica y/o genotóxica, y así corroborar la existencia o no de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, por lo cual es necesario buscar el biomodelo animal ideal. Tuvimos como objetivo de esta carta al editor dar a conocer los resultados finales de este estudio, al evaluar y comparar los índices espontáneos e inducidos en ratones de ambos sexos de las líneas Balb-C, NMRI, OF-1 y C57/BL6/cenp, mediante estos ensayos *in vivo* para determinar la línea más eficiente, sobre la base de la aparición significativa de índices espontáneos más bajos e índices inducidos altos dado por la sensibilidad a sustancias mutagénicas como la ciclofosfamida. Se obtuvo como resultado que la línea Balb-C en ambos sexos difiere significativa con los demás líneas donde se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos más altos con ciclofosfamida, teniendo en cuenta los indicadores tales como concentración espermática en epidídimos, frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides anómalas, número de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos, índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos viejos), total de células con aberraciones estructurales en los cromosomas, índice mitótico (número de células que se encontraban en la fase de división celular de metafase) y el porcentaje de leucocitos en sangre periférica que experimentan daño en el ADN según nivel 1, 2, 3, 4 de menor a mayor daño.¹⁰⁻

¹⁵ Además la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y menos sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos más altos e inducidos más bajos.

Palabras clave: Espontánea, inducida, ensayo cometa, ensayo de micronúcleos, ensayo de aberraciones cromosómicas, ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, ratones Balb-C, ratones NMRI, ratones OF-1, ratones C57/BL6/cenp, ciclofosfamida.

Abstract

The mice as biomodel in the genotoxicity assays, summary of final results of the study, two years of experiences, Finlay Institute, Cuba.

For the new products evaluation is necessary to know the spontaneous and induced frequency of appearance of each one of the phenomenons that studies the genetic toxicology to use in the biomodel, for this way to realize that we are in front of a mutagenic substance and genotoxic, and this way to corroborate the existence or not an mutagenic effect and in that measured it is manifested, for this reason it is necessary the search of the ideal animal model. The aim of this editor letter is to give the final results of this study, when evaluating and to compare the spontaneous and induced indexes in mice of both sexes of the Balb-C, NMRI, OF-1 and C57/BL6/cenp lines, by means of these *in vivo* assays to determine the most efficient line, on the base of the significant appearance of lower spontaneous indexes and high induced indexes given by the sensibility to mutagenic substances as the cyclophosphamide. We was obtained as a result that the Balb-C line in both sexes differs significant with the other lines where they met the lower spontaneous indexes and the highest induced indexes with cyclophosphamide, keeping in mind the indicators such as epididymi spermatic concentration, spontaneous frequency of anomalous heads sperms, erythrocytes number in bone marrow with micronucleis, citotoxicity index (relationship among old erythrocytes/young erythrocytes), cells total with structural aberrations in the chromosomes, mitotic index (number of cells in metaphase) and the leukocytes percent in peripheral blood that they experience damage in the DNA according to level 1, 2, 3, 4 of smaller to more damage. Also the C57/BL6/cenp line was the less efficient and less sensitive to the mutagen, being obtained the higher spontaneous results and the lowest induced results.

Key words: Spontaneous, induced, comet assay, micronucleis assay, chromosomal aberration assay, head sperm morphology assay, Balb-C mice, NMRI mice, OF-1 mice, C57/BL6/cenp mice, cyclophosphamide.

Introducción

Por lo general todos los centros que se dedican a la búsqueda de fármacos, principios activos, vacunas, fertilizantes etc; constan con un laboratorio de toxicología experimental y analítica, esta línea de investigación es priorizada en nuestro país, teniendo en cuenta, la necesidad de constar con medicamentos nacionales como parte de nuestra política de salud, encaminada a incrementar la expectativa y calidad de vida de la población cubana.

Como es conocido por todos para la nueva introducción de productos en la industria farmacéutica como parte de su desarrollo para su uso en humanos es necesario, previo al inicio de la fase de ensayos clínicos (ensayos en humanos), realizar un grupo de estudios toxicológicos generales y especiales en animales de laboratorio, que permitan determinar el potencial tóxico del mismo, para poder sopesar el riesgo-beneficio.¹ Como parte de la evaluación toxicológica se realiza el tamizaje de la potencialidad genotóxica (determinar la toxicidad a nivel de ADN, genes y cromosomas), dentro de la cual los ensayos *in vivo* dan el mayor peso de la conclusión final de si la sustancia investigada es o no mutagénica y/o genotóxica. Dentro de estos ensayos se encuentra el de electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa), evaluando el daño a nivel de la estructura primaria del ADN, el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en médula ósea de roedores el cual determina la ocurrencia o no de daño en cromosomas y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en roedores determinando el efecto genotóxico a nivel celular.²

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia espontánea e inducida de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética en el biomodelo a utilizar, para de esta forma darnos cuenta que estamos frente a una sustancia mutagénica y/o genotóxica, y así corroborar la existencia o no de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, además al ser estas pruebas tan decisivas en la evolución positiva o negativa de un nuevo producto de índoles diversas es necesario buscar el biomodelo animal ideal.²

Para lo cual tuvimos como objetivo en esta carta al editor dar a conocer nuestros resultados finales de estudio, al evaluar y comparar los índices espontáneos e inducidos en ratones de ambos sexos de las líneas Balb-C, NMRI, OF-1 y C57/BL6/cenp, mediante estos <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

ensayos *in vivo* para determinar la línea más eficiente, sobre la base de la aparición significativa de índices espontáneos más bajos e índices inducidos altos que es lo mismo que sensibilidad a sustancias mutagénicas como lo es la ciclofosfamida (CF).

Desarrollo

Ensayos realizados en cada Línea de ratón: ²⁻⁴

1. Electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa).
2. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea.
3. Ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea.
4. Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

Procedimientos: En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones a administrar de cada sustancia se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo/ensayo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratones/grupo/sexo/ensayo. En algunos ensayos se realizaron tres réplicas para un total de 15 ratones/grupo/sexo/ensayo.

En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, en el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2%, el cual es un vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo,^{5,6} en el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9%, ya que esta demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias hidrofílicas a preparar,⁷ todos los grupos fueron administrados durante un periodo de 14 días en las hembras y 35 días en los machos (duración del ciclo espermático en el ratón), preparadas 2 horas antes de la administración.

Hemos de destacar que se utilizaron 3 grupos controles entre negativos y solventes para analizar una n mayor, garantizando de esta forma resultados significativos, veraces y una mayor confiabilidad.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF a una dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal, mutágeno adquirido por la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, el cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9%.⁸ La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, 48 horas y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado, para el caso del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide los ratones machos se administraron 5 días consecutivos y sacrificados 35 días a partir de la última administración del mutágeno.⁹

Resultados

Se obtuvo como resultado que la línea Balb-C en ambos sexos difiere significativa con los demás líneas donde se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos más altos con CF, teniendo en cuenta los indicadores tales como concentración espermática en epidídimos, frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides anómalas, número de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos, índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos viejos), total de células con aberraciones estructurales en los cromosomas, índice mitótico (número de células que se encontraban en la fase de división celular de metafase) y el porcentaje de leucocitos en sangre periférica que experimentan daño en el ADN según nivel 1, 2, 3, 4 de menor a mayor daño.¹⁰⁻¹⁵ Además que la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y menos sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos más altos e inducidos más bajos.¹⁶

Referencias

1. Mortelmans K, Rupa D. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56:379-397.
2. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(3):23-40.
3. 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.
4. Arencibia DF, Rosario LA. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa *in vivo* en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Retel* 2010; 26(1):1-12.
5. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R&D* 2006; 7:233-241.
6. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exptl Clin Rest* 2005; 31:193-198.
7. Shayne CG. *Animal Models in toxicology*. Chapter 2, The Mouse. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.24-72.
8. 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 Farmacia* 2009; 43(2):8-9.
9. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodriguez E. Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España; 2006.p.2-3.
10. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *Retel* 2009; 20(1):2-14.

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. 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.
13. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. Revista Cubana Farmacia 2010; aceptada, en impresión.
14. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y. Comparación entre tres líneas de ratones en la frecuencia espontánea e inducida de rupturas de simple cadena y formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica, mediante el Ensayo Cometa. Biotecnología Aplicada 2010; en arbitraje, datos de archivos.
15. Gámez R, Fernández I, Acosta PC, Alemán C, Rodeiro G, Rodríguez M. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. Rev. CENIC, Ciencias Biológicas 2000; 31(3):211- 216.
16. Arencibia DF, Rosario LA, Hernández Y, Curveco D. Evaluación de la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en tres ensayos de genotoxicidad potencial. Retel 2010; 26(2):13-35.

Recibido: 01/03/10

Aceptado: 02/03/10