

Evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo de dominantes letales, un artículo técnico.

Tamara Hernández Salazar*, **Daniel Francisco Arencibia Arrebola***, **Luis**

Alfredo Rosario Fernández**.

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

** Instituto 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: Tamara Hernández Salazar. Email: thernandez@finlay.edu.cu

Resumen

El ensayo de genotoxicidad *in vivo* de letales dominantes mide los cambios genéticos inducidos de manera dominante, que matan al cigoto. El objetivo de este trabajo es definir el protocolo de esta prueba en ratones, estandarizada bajo nuestras condiciones experimentales, lo cual ayudaría a proveer a los toxicólogos de un material de partida para la realización de este ensayo *in vivo* en sus laboratorios. Tuvimos en cuenta el procedimiento experimental, las variables a analizar y el análisis estadístico de los resultados.

Palabras claves: Genotoxicidad, ensayo de dominantes letales, ensayos *in vivo*, procedimiento experimental.

Abstract

Genotoxicity evaluation by means of the lethal dominant assay, a technical article.

The lethal dominant *in vivo* genotoxicity assay it measures the induced genetic changes in a dominant way that kill to the zygote. The objective of this work is to define the protocol of this test in mice, standardized under our experimental conditions, which would help to provide to the toxicologists of a departure material for the realization these *in vivo* assay in their laboratories. We considered the experimental procedure, the variables to analyze and the statistical analysis of the results.

Key words: Genotoxicity, lethal dominant assay, *in vivo* assays, experimental procedure.

Introducción

Los sistemas de prueba se idearon con el propósito de evaluar en organismos de bioensayo los efectos producidos por agentes químicos ambientales, a los que el hombre está expuesto.

La producción de alteraciones hereditarias podría ser el resultado de la exposición crónica a agentes químicos poderosos, aun en concentraciones bajas. Las mutaciones son cambios abruptos heredables en la composición y arreglo de los genes, los cuales están formados por ácido desoxirribonucleico. La mayoría de las mutaciones producen efectos deletéreos, otros efectos con poca o ninguna consecuencia y otras son ventajosas para el organismo.¹ La magnitud de la proporción espontánea de mutación, la manera en que la selección actúa en las diferentes combinaciones génicas, y el tamaño y la estructura de las poblaciones humanas son suficientes para mantener una fuente rica de variabilidad. Sin embargo, una proporción de mutación grande y artificialmente creada es potencialmente capaz de producir una declinación en la salud genética, a menos que exista una selección grande en contra de los genes mutantes deletéreos. Este tipo de selección ocurre en las poblaciones naturales, pero en las poblaciones humanas la eficiencia de la medicina moderna tiende a reducir la selección en contra de los caracteres deletéreos.²

Las características que debe tener todo sistema de prueba son básicamente la sensibilidad y la capacidad de reproducirse. La sensibilidad de un sistema de prueba se define como la capacidad del sistema para detectar con facilidad y precisión estadística un pequeño efecto mutagénico inducido. La capacidad de reproducción implica la similitud de respuesta de un sistema en y entre laboratorios. Esto se logra solamente con el establecimiento de protocolos estandarizados y entrenando al personal para que adquiera niveles técnicos competentes. Esta capacidad de reproducción es también deseable en la forma de respuestas similares entre los diferentes sistemas, lo cual permitiría llegar a interpretaciones confiables de los datos positivos y negativos.³

En la actualidad existen más de 150 sistemas de prueba, entre los más comúnmente empleados se utilizan los que detectan mutaciones, rompimientos cromosómicos (clastogenia) y recombinación mitótica (recombinación en células somáticas), por varias razones: detección

de mutaciones en células germinales, predicción de la carcinogénesis, investigación de las propiedades bioquímicas de los compuestos y para cumplir con los reglamentos de los organismos reguladores.⁴

En última instancia los sistemas de prueba miden la habilidad de una sustancia para producir un efecto genotóxico de tipo cualitativo, de modo que éstos indican un probable riesgo para el hombre.

La batería de pruebas seleccionada debe ser capaz de identificar a los agentes que tienen una afinidad específica por el ADN; debe tener una capacidad metabólica apropiada, ser reproducible y transferible entre laboratorios.⁵

Uno de los ensayos utilizados lo constituye la prueba de letales dominantes. Mide los cambios genéticos inducidos de manera dominante, que matan al cigoto. En mamíferos se observa a través de la reducción en el tamaño de la camada, midiendo y contando el número de implantes que sobreviven entre otros efectos.⁶

El objetivo de este trabajo es definir el protocolo de esta prueba en ratones, estandarizada bajo nuestras condiciones experimentales, la cual ayudaría a proveer a los toxicólogos de un material de partida para la realización de este ensayo *in vivo* en sus laboratorios. Tuvimos en cuenta el procedimiento experimental, las variables a analizar y el análisis estadístico de los resultados.

Desarrollo

Objetivos: Determinar la incidencia de las pérdidas fetales tempranas o tardías en el embarazo tras el tratamiento con el agente en estudio de ratones machos o hembras.

Esta metodología permite la evaluación de los efectos sobre células germinales masculinas o femeninas a través de la detección de daño cromosómico.⁷

Procedimiento general.

1. Selección de los niveles de dosis, sexo, momento del sacrificio, vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

Estos parámetros se encontrarán en el protocolo experimental para cada tipo de sustancia.

1.1 Se utilizarán no menos de 20 animales tratados por grupo/sexo.⁸

1.2 Las condiciones de tratamiento variarán entre 5 administraciones separadas 24 horas o durante el período de espermatogénesis en el caso de los machos (8 semanas) y de 6 semanas para las hembras. La vía de administración será aquella común a la utilizada en los humanos. Las dosis a emplear estarán en función de los resultados de los estudios de toxicología subcrónica y crónica, de la farmacocinética del producto y de la dosis presumible a utilizar en humanos en el caso de medicamentos.

1.3 Los animales serán codificados.

1.4 Es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.⁹

2. Procedimiento experimental.

2.1 Después que los animales son aceptados por su adecuado estado de salud, son entonces ubicados aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales.

2.2 Las hembras se distribuyen aleatoriamente a razón de 6/jaula y los machos 1/jaula.

2.3 Al terminar el tratamiento los animales (machos o hembras) tratados son apareados a razón de 1:2 durante 1 semana con animales no tratados vírgenes. En caso que los tratados sean los machos se realizarán apareamiento por dos semanas consecutivas con hembras no tratadas.¹⁰

Machos Tratados:

- 1 macho tratado con 2 hembras sin tratar durante la primera semana post tratamiento (se define como primera semana).

1 macho tratado con 2 hembras sin tratar durante la segunda semana post tratamiento (se define como segunda semana).

Hembras Tratadas:

- 1 macho no tratado con 2 hembras tratadas durante una semana post tratamiento.

2.4 Al terminar este apareamiento, las hembras son retornadas a las cajas según el grupo experimental.

2.5 Se debe anotar el último día de la semana de apareamiento para el posterior sacrificio de 13 a 15 días después del día medio de esta semana.¹¹

3 Sacrificar los ratones hembras por dislocación cervical. Ponerlas en posición decúbito supino, limpiar con alcohol al 70 % la región abdominal y abrir la región con tijeras oftálmicas para dejar al descubierto todas las vísceras.

3.1 Separar el útero del resto de las estructuras y exponerlo para que los ovarios puedan ser fácilmente observados.¹²

3.2 Confirmar y reportar la presencia o no de embarazo, de existir embarazo se procederá a contar los cuerpos lúteos y analizar los implantes.

4. Cuerpos Lúteos

4.1 Los ovarios serán extraídos y colocados en un recipiente rotulado indicando los ovarios derecho e izquierdo.

4.2 Los cuerpos lúteos serán inmediatamente contados en cada uno de ellos bajo el microscopio de disección ó estereoscopio y su número registrado en el modelo que se anexa. Los cuerpos lúteos de la preñez se distinguen en el ovario como esferas grandes, de color rosado, hidratadas, mucho mayores que los restantes cuerpos lúteos de ovulación. Para su mejor conteo se deben utilizar agujas para bajo el microscopio estereoscopio realizar la separación de cada uno de ellos.¹³

5. Implantes.

5.1 El útero grávido será extraído con cuidado de no confundir los cuernos derecho e izquierdo.

5.2 Usando una pinza y una tijera pequeñas se abrirán los cuernos desde el extremo ovárico hasta la vagina a lo largo del lado opuesto a los sitios de implantación, exponiendo los sacos amnióticos. Debe tenerse cuidado de no dañar los fetos.¹⁴

5.3 Se abrirán los sacos amnióticos para examinar y clasificar los implantes:¹⁵

- a) vivos, esta cualidad está dada por total desarrollo y color rosado.
- b) muerte tardía ó reabsorción tardía, en éstos ya ocurrió la organogénesis, de tal forma que el embrión es visible, pero este es pálido y menos desarrollado que un implante vivo.
- c) muerte temprana ó reabsorción temprana, donde la muerte ocurrió poco después de la implantación, de tal forma que el embrión no es visible. Lo que se distingue es un nódulo o tejido placentario degenerado y coágulos de sangre no oxigenados.

6. En la recogida de datos se detallará cada uno de los cuernos y ovarios (izquierdo y derecho).¹⁶

- a. La codificación de los animales de ambos sexos.
- b. Presencia o no de embarazo.
- c. Registro de números de implantes (I), fetos vivos (Fv) o muertos, definidos como reabsorciones (Rte o Rtd, tempranos o tardíos).¹⁷
- d. Registro de número de cuerpos lúteos (CI)

A partir de estos datos se calcularán sus frecuencias por hembra embarazada. Además se expresan los siguientes índices:¹⁵

Reabsorciones Totales: $Rt = Rte + Rtd$

Letalidad preimplantación: $(CI-I)/CI$.

Letalidad postimplantación: $(Rt)/I$.

Letalidad total: $(CI-Fv)/CI$.

7. El análisis estadístico se puede realizar a través de pruebas paramétricas y no paramétricas, realizando estas últimas sólo en caso de que la distribución de los datos corresponda con la normal o binomial.¹⁷

Las pruebas no paramétricas se usarán para datos que no sigan las distribuciones antes mencionadas. Se utilizará primero la prueba Kruskal-Wallis y se procederá a realizar comparaciones por pares de grupos para determinar cuales difieren a través de la prueba

Mann-Whitney y si el Kruskal-Wallis es estadísticamente significativo.¹⁴

La prueba paramétrica a utilizar será el ANOVA. Cuando la distribución no corresponde con la normal, transformaciones tales como: raíz cuadrada, Freeman-turkey Poisson y la angular (arcoseno) pueden ser usadas.

Referencias

1. Dacre JC. Dominant letal study of sulfur mustard in males and female rats. *J Appl Toxicol* 1993; 13(5):196-209.
2. Green S, Auletta A. Current status of bioassays in genetic toxicology the dominant assay. A report of the U.S. EPA. *Gene Tox. Program. Mut Res* 1985; 154:42-67.
3. Rodeiro I, Gámez R, Fernández I, Más R, Alemán C. Estudio de la inducción de letales dominantes del D-002 en ratones NMRI de los dos sexos. *Rev Cubana Invest Bioméd* 1999; 18(1):12-16.
4. Bishop JB, Kodell RL, Whrornton EB, Domon OE. Dominant lethal test response with IMS and TEM using different combinations of male and female stocks of mice. *Mutation Research* 1983; 121:273-280.
5. Bateman A. The Dominant Lethal Assay in the male mouse. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Second editions, edited by B.J. Kelbery. Elsevier Science Publishers; 1984.p.37-38.
6. Lovell DP, Anderson D, Jenkinson PC. The use of battery os strains of mice in factorial design to study the induction of dominant lethal mutations. *Mutation Research* 1987; 187:37-44.
7. Kirk KM, Lyon MF. Induction of congenital malformations in the offspring of males mice treated worth x rays at pre-meiotic and post meiotic stages. *Mutation Research* 1984; 173:35-40.
8. Elilling UH, Machemer L, Bruselmaier W, Dycka J, Frohberg H, Kratochivilova J, Lang R, Korke D. Standard protocol for the dominant lethal test on male mice, *Archiv Toxicol* 1974; 39:173-185.
9. Chamorro G, Salazar M, Salazar S, Mendoza T. Farmacología y toxicología de *Guatteria gaumeri* y alfa-asarona / Pharmacology and toxicology of *Guatteria gaumeri* *Rev. invest. Clín* 1993; 45(6):597-604.
10. Chun JS, Beeper B. Glutaraldehyde: two-generation reproduction study in the drinking water of CD® rats (Glutaraldehído: estudio de reproducción de dos generaciones en el agua de ratas CD®). 92U1059 Realizado en Bushy Run Research Center para Union

Carbide Chemical and Plastics Company, Informe de The Dow Chemical Company, Midland, MI; 1994.p.56-68.

11. National Toxicology Program (Programa nacional de toxicología). Estudios de toxicología y carcinogénesis del glutaraldehído (CAS No. 111-30-8) en ratas F344/N y ratones B6C3F1 (estudios de inhalación). Serie de informe técnico N° 490. Publicación de NIH N° 99-3980, Department of Health and Human Services (Departamento de Salud y Servicios Sociales), Research Triangle Park, NC; 1999.p.42-69.
12. Hardisty JF. Revisión de pares de patología y revisión de grupo de trabajo de patología (PWG, en inglés) de leucemia linfocítica granular grande (LGL) en un estudio combinado de toxicidad/oncogenicidad crónicas en el agua para beber con glutaraldehído en ratas Fischer 344 hembras. Informe interno de The Dow Chemical Company, Midland, MI; 2003.p.22-37.
13. Peña E, Barrueco C, Herrera A, García P. Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. Rev Exp Anim 1990; 1(1):41-52.
14. Japanese Guidelines. Mutagenicity test in occupational safety and health acts: test guidelines and GLP Investigation. Div Chem Subst. Tokyo: Japan Ind. Safety Health Assoc 1991; 2:27-29.
15. Sofuni T. Japanese guidelines for mutagenicity testing. Environ Mol Mutagen 1993; 21:2-7.
16. Sánchez Á, Fonseca G, Capiro N, Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Rev Cubana Farm 2000; 34(1):34-43.
17. 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.

Recibido: 04/03/10

Aceptado: 10/03/10