

## El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos.

**Daniel Francisco Arencibia Arrebola<sup>\*1</sup>, Luis Alfredo Rosario Fernández<sup>\*\*2</sup>,  
Yolanda Emilia Suárez Fernández<sup>\*\*\*3</sup>, Livan Delgado Roche<sup>\*\*\*\*4</sup>.**

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

\*\*Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

\*\*\*Doctor en Medicina Veterinaria, Profesor Titular, Doctor en Ciencias Veterinarias.

\*\*\*\*Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

Centro de Trabajo:

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

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

<sup>3</sup>Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Avenida 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: [darencibia@finlay.edu.cu](mailto:darencibia@finlay.edu.cu)

## Resumen

El ensayo de micronúcleos de médula ósea, es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por numerosas agencias reguladoras, es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea. Este sistema permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas. En este artículo se reporta la frecuencia basal de micronúcleos en médula ósea de ratones NMRI de ambos; así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.

**Palabras clave:** Espontánea, inducida, ensayo de micronúcleos, ratones NMRI, ciclofosfamida.

## Abstract

### ***NMRI mice as biomodel in the micronuclei assay.***

The micronuclei assay in bone marrow, is one of those included at the moment inside the toxicological battery of obligatory studies demanded by numerous regulatory agencies, it is easily to reproduce and it offers clear information on the cellular proliferation in bone marrow. This system allows registering *in vivo* the capacity of the chemical substances to induce chromosomal ruptures to interfere or the chromosomes metaphases migration during the mitosis of the somatic cells. In this article we reported the basal frequency of micronuclei in bone marrow of NMRI mice of both sexes; as well as the events induced frequency after the cyclophosphamide administration by intraperitoneal route (50 mg/kg), mutagen reference used as positive control.

**Key words:** Spontaneous, induced, micronuclei assay, NMRI mice, cyclophosphamide.

## Introducción

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno.<sup>1,2</sup> Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer.<sup>3, 4</sup>

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre.<sup>4, 5</sup> En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante.<sup>6</sup>

El ensayo de micronúcleos de médula ósea, es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH),<sup>7,8</sup> es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.<sup>8,9</sup> Este sistema permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.<sup>9</sup>

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.

En este artículo decidimos reportar la frecuencia basal de aparición de micronúcleos de médula ósea de ratones NMRI de ambos sexos, así como la frecuencia inducida de eventos, tras la administración de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal, mutágeno de referencia utilizado como control positivo.<sup>10</sup>

## **Materiales y métodos**

### **- Animales.**

Se utilizaron ratones adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ), humedad relativa ( $60 \% \pm 10 \%$ ) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio.<sup>11</sup>

### **- Administración y dosificación.**

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

En el grupo experimental 1 (control negativo), utilizamos animales no tratados como control negativo, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo de los demás grupos.

En el grupo experimental 2 (sustancia vehículo 1), 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,<sup>12,13</sup> administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg durante 14 días, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 3 (sustancia vehículo 2), utilizamos el NaCl al 0,9 %, ya que esta demostrado que el mismo es el disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar,<sup>14</sup> administrado por vía oral en dosis de 2 mL/kg durante 14 días, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, siendo adquirida por la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %.<sup>10, 15</sup> La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, en un volumen máximo 15 mL/kg 48 y 24 horas antes del sacrificio programado.

**- Observaciones clínicas.**

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

**- Sacrificio.**

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en previa atmósfera de éter, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 14 días. En el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, el sacrificio se realizó 24 horas posteriores a la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos en cada una de las series montadas.<sup>16,17</sup>

**- Exámenes realizados.*****Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.***

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 3 ml de suero bovino fetal. La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos.<sup>17</sup>

Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas".<sup>17</sup> Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.<sup>15, 17</sup>

***Análisis estadístico***

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN). Los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de

Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene).<sup>17</sup> Por lo cual estas variables fueron analizadas mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El número total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado.<sup>17</sup> En ambos tipos de variables el nivel de significación establecido fue  $\alpha = 0.05$ . Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.<sup>17</sup>

## Resultados y discusión

En ninguna de las series experimentales tanto en los grupos control negativo como en los grupos tratados con las sustancias solventes 1 y 2 en ambos sexos se encontraron animales con signos clínicos indicativos de toxicidad, resultados similares se obtuvieron en el grupo de CF igualmente en ambos sexos.

Teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad dado por la relación (EP/EN), se puede observar en la tabla 1 que el grupo control negativo no difirió significativamente con los dos grupos en los que se administraron las sustancias solventes 1 y 2. Por lo cual estos resultados constituyen los valores en los cuales se encuentra de forma espontánea esta variable en esta especie de ratón estando en el rango de 1,16-1,17 con una desviación estándar de 0,02-0,03 en los machos y en las hembras se encuentra entre 1,12-1,15 con una desviación estándar de 0,02-0,05. Estos resultados se encuentran por debajo de los obtenidos en la línea de ratón Balb/c; teniendo en cuenta esta variable esta línea de ratón es menos eficiente que la Balb/c.<sup>10</sup>

En tanto los resultados obtenidos con el uso de la CF difieren de forma significativa al comparar este índice con el grupo control negativo y las sustancias solventes 1 y 2. En los machos los resultados de inducción se encuentran entre  $0,92 \pm 0,05$  y en las hembras fue de  $0,90 \pm 0,03$ , Estos resultados igualmente fueron mayores a los obtenidos en la línea Balb/c; lo cual demuestra que la línea NMRI en ambos sexos es menos susceptible a la CF que la Balb/c.<sup>10</sup>

El grupo control negativo no difirió de forma significativa con las sustancias solventes 1 y 2 al tener en cuenta el índice de genotoxicidad dado por el % de EP portadores de

micronúcleos. El % de EP portadores de micronúcleos en ratones NMRI se encuentra entre 0,17-0,19 % en los machos y entre 0,16-0,19 % en las hembras. Resultados que se encuentra por encima de los reportados por nosotros en la línea de ratones Balb/c.<sup>10</sup> En tanto el grupo tratado con la CF difirió con el control negativo y los tratados con las sustancias solventes 1 y 2, demostrando la inducción experimental,<sup>18</sup> se obtuvo un % de EP portadores de micronúcleos inducidos de  $1,80 \pm 0,61$  en los machos y en las hembras estuvo en el rango de  $1,77 \pm 0,53$ . Resultados que fueron similares a la línea Balb/c en los machos y estuvieron por encima en las hembras.<sup>10</sup>

El número de EP con 1, 2 o más micronúcleos también fue similar en los grupos tratados con las sustancias vehículos 1 y 2 al compararlos con los animales controles los cuales se encuentran en el rango de 27-30 EP con micronúcleos totales como promedio en los machos y de 26-30 como promedio en las hembras (ver tabla 2). Estos resultados concuerdan con los hallados por Yiqiang y col en el 2005, los cuales evaluaron su producto en este ensayo *in vivo* utilizando como biomodelo ratones NMRI de ambos sexos.

Este indicador de cuan genotóxico pueden llegar a ser las sustancias evaluadas por nosotros fue mayor y significativamente diferente en los animales tratados con CF. El número total de micronúcleos que indujo la CF en este biomodelo fue de 286 en los machos y 280 en las hembras. El aumento encontrado en el grupo tratado con CF evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada,<sup>19</sup> lo cual evidencia lo útil que es este mutágeno como control positivo en este ensayo el cual nos permite evaluar a la CF como un potente agente formador de micronúcleos.<sup>8, 9, 10, 15, 18-20</sup>

## Conclusiones

Se pudo concluir que la línea de ratón NMRI constituye un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de eritrocitos en médula ósea de ratones de ambos sexos (índices de genotoxicidad y citotoxicidad), así como se destacó la sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida administrada en dosis de 50 mg/kg por vía i.p en ambos ensayos. Además se demostró que existen otras líneas comercializadas en Cuba ya evaluadas en este ensayo como la Balb/c que manifiesta mayor eficiencia al encontrarse estas variables de forma espontánea en rangos más bajos.



**Tabla 1. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones NMRI de ambos sexos**

Grupo	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
<b>Machos</b>					
Control negativo	15	1072 ± 12,2	928 ± 11,4	1,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02
Sustancia vehículo 1	15	1079 ± 21,0	921 ± 20,2	1,17 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Sustancia vehículo 2	15	1076 ± 20,0	924 ± 19,9	1,16 ± 0,03	0,19 ± 0,04
Control positivo (CF) <sup>a</sup>	15	958 ± 21,2*	1042 ± 19,7*	0,92 ± 0,05*	1,80 ± 0,61*
<b>Hembras</b>					
Control negativo	15	1058 ± 10,4	942 ± 10,8	1,12 ± 0,02	0,19 ± 0,06
Sustancia vehículo 1	15	1070 ± 20,8	930 ± 21,0	1,15 ± 0,05	0,16 ± 0,04
Sustancia vehículo 2	15	1069 ± 20,1	931 ± 21,4	1,15 ± 0,03	0,17 ± 0,03
Control positivo (CF) <sup>a</sup>	15	950 ± 20,4*	1050 ± 19,4*	0,90 ± 0,03*	1,77 ± 0,53*

CF (Ciclofosfamida), <sup>a</sup> Administración por vía ip.  
Determinaciones en 2 000 células/animal. \*p<0.05 (comparación con el control, ANOVA).  
(X media; DE desviación estándar, para las tres réplicas experimentales).

**Tabla 2. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones NMRI de ambos sexos.**

Grupo	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
<b>Machos</b>					
Control negativo	15	27	20	6	1
Sustancia vehículo 1	15	28	18	9	1
Sustancia vehículo 2	15	30	22	7	1
Control positivo (CF) <sup>a</sup>	15	286*	186*	86*	14*
<b>Hembras</b>					
Control negativo	15	30	26	3	1
Sustancia vehículo 1	15	26	19	6	1
Sustancia vehículo 2	15	28	18	9	1
Control positivo (CF) <sup>a</sup>	15	280*	181*	58*	12*

CF (Ciclofosfamida), <sup>a</sup> Administración por vía ip.  
Determinaciones en 2 000 EP/animal.  
\*p<0.05 (comparación con el control, Prueba de Chi-cuadrado, para las tres réplicas experimentales).

---

**Referencias Bibliográficas**

1. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar J.N, Poddar G, Nandy A.K. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 534:133-143.
2. Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular mutagenesis* 2003; 41:85-91.
3. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39:119-126.
4. Mortelmans K, Rupa D. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56:379-397.
5. Motelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 2000; 455:29-60.
6. García-Peñalver L, Sureiro R.A, Garrido M. J. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental; 2000.p.109-110.
7. Cox S.H, Ann M. *Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing*. Second Edition, Revised and Expanded. Research Triangle Park, North Carolina; 1999.p.178-179.
8. Schmid W. The micronucleus assay validation. *Mutation Research* 1975; 24:9-11.
9. Alamone M.F. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1994; 23:239-240.
10. 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.
11. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc; 1997:155-162.

12. Arruzazabala M.L, 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.
13. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala M.L. 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.
14. Shayne C.G. 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.
15. Arencibia D.F, 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 de Farmacia* 2009; 43(2):8-9.
16. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(3):23-40.
17. 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.
18. 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.
19. Yiqiang L, Mengmeng Q, Liwei S, Yulin W, Yuangao CH. Genotoxicity study of phenol and o cresol using the micronucleus test and the comet assay. *Toxicol & Environ Chem* 2005; 87(3):365-372.
20. Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, García H. Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *Revista CENIC* 2005; 36 (Especial):14-18.

**Recibido: 05/07/10**

**Aceptado: 15/07/10**