

Trabajo de Revisión

Toxicología Experimental

Ensayo de micronúcleos transplacentarios en roedores, una buena opción en toxicología experimental.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola¹, Luis Alfredo Rosario Fernández², Yolanda Emilia Suárez Fernández³

1. Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.
2. Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.
3. Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. e-mail: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

El ensayo de micronúcleos transplacentario, ha sido desarrollado con el objetivo de evaluar el potencial genotóxico en la descendencia y demostrar la capacidad de un agente de causar daños cromosómicos durante el período prenatal. Éste realiza el registro de aberraciones cromosómicas, demostrando si una sustancia determinada puede ser clastogénica o aneugénica en el feto, a través de la exposición materna. Por lo cual en el presente trabajo se tuvo como objetivo establecer un protocolo para el estudio de micronúcleos transplacentarios, vinculando de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología. Tuvimos en cuenta las características de los animales a utilizar, el apareo, administración y dosificación, método de eutanasia, métodos particulares de trabajo con la muestra desde su obtención (micronúcleos en la madre y en el feto), así como el análisis estadístico de las variables a analizar. Esperemos que sea de la utilidad para todos los profesionales que se dedican a la toxicología experimental.

Palabras claves: Micronúcleos transplacentarios, ratas, ratones, genotoxicidad, embarazo.

Abstract

Transplacental micronucleus assay in rodents, a good option in experimental toxicology.

The transplacental micronuclei assay has been developed aimed at evaluating the genotoxic potential in the descendants, demonstrating the capacity of an agent for causing cromosomal damages during the prenatal period. The registration of the cromosomal aberrations shows when a specific substance may be clastogenic or aneugenic in the fetus through the maternal exposure. Reason why presently work had as objective to establish a protocol for the study of transplacental micronucleus, linking this way the genotoxic and reproductive effect of a drug to evaluate for this methodology. We include the animals characteristics, the mating, administration and dosage, euthanasia method, peculiar methods of work with the sample from their obtaining (mother and fetus micronucleus), as well as the statistical analysis of the variables to analyze. Let us hope it is of the utility for all the professionals that are devoted to the experimental toxicology.

Key words: Transplacental micronucleus, rats, mice, genotoxicity, pregnancy.

Introducción

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo. Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.¹

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.²

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. No obstante gracia al gran desarrollo que ha obtenido esta ciencia es posible realizarlo en cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de decamación de la vagina de la rata.³

La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromerito en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados.⁴

Este ensayo está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*. Por lo general si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o su metabolito activo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.⁵

Por lo cual en el presente trabajo se tuvo como objetivo establecer un protocolo para el estudio de micronúcleos transplacentarios, vinculando de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología.

Desarrollo

Animales.

Se debe trabajar con ratones de la línea Balb/c vírgenes,⁶ de 6 a 7 semanas de edad y fértiles (25-30 g de peso vivo), para que al empezar el estudio se encuentren entre 8-10 semanas, contando las 2 semanas de cuarentena bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento debe ser *ad libitum* y pienso estándar para esta especie. Es posible que en este ensayo se realice en ratas, sobre todo de la línea Sprague Dawley, ya que es de la cual se tiene mayor resultados de investigación. Se utilizaran ratas de ambos sexos adultos jóvenes (6-8 semanas), su peso corporal oscilará entre 180-210 g al término de la cuarentena. Las condiciones ambientales controlados son iguales que en el caso de los ratones.

Durante todo el proceso experimental se debe respetar los principios éticos internacionales establecidos para la investigación con animales de laboratorio.⁷

Apareo.

Pasado el tiempo de cuarentena son sometidos al esquema de apareo a razón de 1 macho por cada 2-3 hembras. Aquellas hembras en las que se haya constatado la presencia del tapón espermático al día siguiente del apareo, se les debe considerar este como el día cero de la preñez.

Procedimiento.

1. Colocar el microscopio y tener a mano los goteros, la solución salina, los portaobjetos, las etiquetas y el papel absorbente.
2. Poner la jaula vacía de la hembra y la correspondiente jaula del macho en el banco. Las cajas deben ser tomadas en el orden en el cual ellas aparecen en el estante. Los pomos de agua tienen que ser retirados o invertidos antes de transferir la jaula.
3. Retirar las tapas de ambas jaulas.⁸
4. Cargar un gotero con unas pocas gotas de solución salina.
5. Tomar una hembra de la jaula del macho y chequear su marca de la oreja.
6. Insertar la punta del gotero 1 ó 2 mm dentro de la vagina de la rata y descargar y cargar suavemente la solución salina del gotero.

7. Colocar la hembra de regreso a su propia jaula.
8. Si un tapón vaginal está presente, anotar la hembra como preñada.
9. Si no hay tapón vaginal presente, depositar el contenido celular en un portaobjetos limpio. Examinar el portaobjetos bajo el microscopio para detectar la presencia de espermatozoides.⁹
10. Si hay espermatozoides presentes, anotar la hembra como preñada.
11. Si no hay espermatozoides presentes, considerar la hembra como no apareada.
12. Repetir el procedimiento para cualquier otra hembra de la jaula del macho.
13. Usar una pipeta limpia para cada hembra a fin de prevenir infecciones vaginales o trasladar espermatozoides de una rata inseminada a otra que no se haya inseminado.¹⁰
14. Cuando las hembras hayan sido examinadas recolocar las tapas en las jaulas del macho y las hembras y retornar las jaulas a sus lugares en el estante.
15. Proceder con la próxima jaula de macho y la correspondiente jaula de hembras.
16. Cuando todas las hembras hayan sido examinadas, firmar y anotar la hora en el diario del proyecto.

Aclaración: La inserción de la pipeta en la vagina demasiado profundamente o el chorro excesivo de salina pueden causar seudopreñez e interrupción del ciclo estral normal.¹¹

De no haber ocurrido el apareo según la citología vaginal puede determinar en que fase se encuentra del ciclo estral:⁹

- Proestro: predominio de células epiteliales nucleadas.
- Estro: presencia de células epiteliales anucleadas fundamentalmente.
- Metaestro: existe la misma proporción entre leucocitos, células epiteliales nucleadas y células cornificadas.
- Diestro: predominio de leucocitos.

Administración y dosificación.

Se formaran grupos experimentales de 8 hembras como mínimo por grupo. Siempre ubicando un control positivo reconocido, tales como ciclofosfamida, bleomicina y mitomicina C. Las dosis serán las que se establecen en la tabla 1.

La vía de administración empleada podría ser intraperitoneal u oral. De utilizarse ratones o ratas se realizaran administraciones los días 14, 15 y 16 de la gestación y 24-48 h después de la última inoculación se procederá al sacrificio de las gestantes por dislocación cervical y se obtendrán las muestras de médula ósea materna e hígado fetal, lo cual será el día 17 o 18 de gestación. El día o los días en los cuales se debe administrar la sustancia utilizada como

control positivo depende del mutágeno, para el caso de la ciclofosfamida se han obtenido buenos resultados de inducción de micronúcleos en el feto del día 11 en adelante.

Método de eutanasia.

El método de eutanasia más utilizado para sacrificar las gestantes es por dislocación cervical en previa atmósfera de éter, no utilizar sustancias que tenga un efecto hepatotóxico agudo reconocido.

Métodos particulares de trabajo con la muestra desde su obtención.

Se deben realizar dos ensayos:

1. Micronúcleos en médula ósea materna, para corroborar la genotoxicidad de su producto por vía transplacentaria: Este ensayo se debe realizar mediante el mismo protocolo de extracción y tratamiento de las células de la médula ósea propuesto por Arencibia y col., 2009, y la OECD 1997, en ratones adultos.^{2,12}

Resumen

Un fémur de cada animal será extraído y la cavidad medular se lavará gentilmente por flujo introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 3 ml de suero bovino fetal (SBF). La médula así obtenida diluida con el SBF se centrifugará a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizará un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se deben mantener 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas se codificarán, el análisis se realizará por dos observadores independientes y las observaciones serán realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión).^{2,12} Se contabilizará la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se debe calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad. Posteriormente se calculará 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 para determinar el grado de genotoxicidad.²

2. Micronúcleos transplacentarios en hígado fetal:

Al extraer los fetos, al menos el 50-60% del total de estos debe ser analizados, de ser posible se deben analizar en su totalidad, pero no en un número menor de 5 fetos/animal.

Se debe realizar una ligera incisión en la cavidad abdominal, extrayendo el hígado en su totalidad para el caso de fetos de ratón, en el caso de fetos de ratas se procede a tomar la mitad de este. Para luego ser depositado en un mortero estéril que contenga 4-5 mL de suero bovino fetal y con ayuda de una malla proceder a la maceración. Una vez macerado se centrifugará a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizará un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se deben mantener 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos.

Las láminas se codificarán, el análisis se realizará por dos observadores independientes y las observaciones serán realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión).^{2,12} Se contabilizará la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se debe calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad. Posteriormente se calculará 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 para determinar el grado de genotoxicidad.^{2,12}

Análisis estadístico.

La citotoxicidad (EP/EN) se evalúa primariamente por ANOVA de cumplir los supuestos, datos distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), que exista dependencia entre las observaciones y presenten homogeneidad de varianzas (test de Levene), sino por el ensayo no paramétrico de Kruskal Wallis. Mientras que la frecuencia de EP portadores de MN se evalúa mediante la prueba de Kruskal Wallis, pero igualmente de cumplir los supuestos para ANOVA se recomienda utilizar esta prueba. Para el caso de la comparación del grado de genotoxicidad dado por el número de EP totales con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizarán mediante la prueba de Chi-cuadrado.² Siendo el nivel de significación establecido de $\alpha=0.05$ para variables continuas y de $\alpha=0.01$ para variables categóricas.

Tabla 1. Dosis de cada mutágeno.

Mutágeno	Dosis/especie (mg/kg, vía intraperitoneal)	
	Rata	Ratón
Ciclofosfamida	50	50
Bleomicina	30-40	20
Mitomicina C	5	2

Referencias bibliográficas.

1. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D. *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res* 1994; 312(2):293-304.
2. 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.
3. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 2000;31:9-15.
4. Gollapudi B, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res* 2000; 354(2):97-99.
5. 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* 2000; 31(3):211-216.
6. Arencibia DF, Rosario LA. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 2010; 27(1):1-8.
7. 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.p.155-162.
8. Marcondes FK, Miguel K, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav* 2001; 74(4-5):435-440.
9. Chateau D, Geiger JM, Samama B, Boehm N. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity. *Skin Pharmacol* 1996; 9:9-16.
10. Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology*. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1975.p.260-265.
11. Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Marrero G. Longitud del ciclo estral en ratas Sprague Dawley tratadas *in útero* con extracto de *Roystonea regia*. *Rev Cub Farm* 2009; 43(3):1-7.
12. OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OCDE TG 475 (Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells). Anexo B11; 1997.p.5-6.

Recibido: 25/10/10

Aceptado: 26/10/10