

Trabajo de Revisión Toxicología Experimental

Líneas murinas como biomodelos eficientes en ensayos de genotoxicidad.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola ^{*1}, Luis Alfredo Rosario Fernández ^{}, Yolanda Emilia Suárez Fernández ^{***}, Alexis Vidal Novoa ^{****}.**

*Instituto Finlay. Habana. Cuba, **Instituto de Farmacia y Alimentos (U.H). Habana. Cuba, ***Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Facultad de Medicina Veterinaria. Habana. Cuba, **** Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Habana. Cuba.

¹Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay. Avenida 17 e/ 198 y 200, Reparto Siboney. Municipio Playa. La Habana. Cuba. Apartado postal 16017, código postal 11600.
E-mail: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En este artículo damos a conocer los resultados de 5 años de estudios de nuestro equipo de trabajo, al evaluar y comparar la eficiencia como biomodelos en ensayos de genotoxicidad de diferentes líneas de ratones y ratas en ambos sexos. En todos los ensayos realizados la línea de ratones Balb/c resultó ser el biomodelo ideal, encontrándose los índices espontáneos más bajos e inducidos altos al mutágeno utilizado. Estos resultados demuestran que genéticamente la línea de ratones Balb/c en ambos sexos es más estable que las otras evaluadas.

Palabras claves: Ensayo cometa, micronúcleos, aberraciones cromosómicas, espermatozoide, ratas, ratones.

Abstract

Murine lines as efficient biomodels in genotoxicity assays.

In this article we give to know the results of 5 years of studies of our work team when evaluating and to compare the efficiency as biomodels in genotoxicity assay of different strains of mice and rats in both sexes. In all the evaluated assays the line of Balb/c mice turned out to be the ideal biomodel, found lower spontaneous indexes and induced high indexes to the mutagen used. These results demonstrate that genetically line of Balb/c in both sexes is more stable than the others tested.

Keywords: Comet assay, micronucleus, chromosomal aberrations, sperm, rats, mice.

Introducción

Por lo general los estudios de genotoxicidad en toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías de administración de manera independiente.¹ Estos ensayos además de ser costosos tienen como principal desventaja la inexistencia de un consenso para el uso exclusivo de una especie animal determinada que reproduzca fielmente los procesos fisiológicos a semejanza con los humanos. A manera de regla general el grupo de mamíferos más utilizados han sido los roedores; dentro de este se encuentran las ratas y ratones.¹

El principal problema al respecto radica en que los investigadores utilizan las diferentes líneas genéticas de ratones y ratas existentes del biomodelo de forma azarosa o por conveniencia, pero en la generalidad de los casos esta decisión está lejos de un basamento teórico-práctico que justifique la selección, condicionado fundamentalmente por la falta de estudios al respecto. Esto conduce a que en muchas ocasiones los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación que trabajan productos semejantes o del mismo grupo en diferentes momentos no puedan ser comparables, debido a que es conocido que las diferencias genéticas entre las líneas del biomodelo presentan diferenciaciones en la expresión de los daños a nivel del genoma.²

Esta problemática conduce a pensar que entonces en la actualidad solo aquellos productos que son muy seguros o muy genotóxicos son verdaderamente clasificados mientras que aquellos capaces de causar "pequeños" daños pudieran estar mal clasificados; de ahí la importancia de realizar un estudio comparativo de las tasas espontáneas e inducidas de daños genéticos en las líneas genéticas de ratones y ratas más utilizadas en estos ensayos a los diferentes niveles de expresión; a través de diferentes técnicas de forma tal que les permita a los toxicogenéticos contar con una herramienta potente, avalada estadísticamente, a la hora de seleccionar la línea genética de ratones y ratas para realizar los estudios de mutagénesis y carcinogénesis.

Utilizándose como mutágeno la ciclofosfamida (CF), administrada por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg tanto en ratas como en ratones.^{3,4}

Las variables analizadas fueron el número de unidades arbitrarias de daño al ADN 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. El número de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos y el índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos adultos). También se analizaron el total de células con aberraciones estructurales en los cromosomas y el índice mitótico (número de células que se encontraban en la fase de división celular de metafase). Por último se determinó la concentración espermática en epidídimos y la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides anómalas.

Desarrollo

La sensibilidad de las líneas de ratones Balb/c, NMRI, OF-1 y C57/BL6/Cenp para la realización de diferentes ensayos de genotoxicidad *in vivo* tales como el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica, micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide; resulta extremadamente variable. La comparación de los niveles basales de daños y la determinación de los diferentes niveles de expresión frente a mutágenos como la CF así lo demuestran. Fueron utilizados en este estudio ratones de ambos sexos adultos jóvenes de 8-9 semanas de edad, cuyo peso corporal oscilaba entre 26-30 g.

La comparación de los % de nucleoides espontáneos e inducidos con CF en cada uno de los niveles de daño en el ensayo cometa alcalino mostraron diferencias significativas entre la línea Balb/c y el resto, no así entre las otras líneas evaluadas. La línea Balb/c experimentó los niveles de daño basales más bajos e inducidos aceptables frente a CF.^{5,6}

Al realizar la comparación entre líneas utilizando la técnica citogenética de micronúcleos en médula ósea nuevamente la línea Balb/c difirió con las otras tres líneas

evaluadas en ambos sexos. En esta línea se obtuvieron los resultados espontáneos más bajos e inducidos más altos, destacándose la sensibilidad de este biomodelo animal para detectar compuestos clastogénicos.^{5,7-10} Por su parte, en el ensayo de aberraciones cromosómicas útil para detectar *in vivo* sustancias que inducen aberraciones de tipo estructural en células de la médula ósea, nuevamente se encontró diferencias significativas entre la línea Balb/c en ambos sexos con las demás líneas evaluadas; por el hecho de tener los índices espontáneos más bajos e inducidos intermedios.¹¹⁻¹⁴ La línea de ratones OF-1 también difirió de forma significativa de la C57BL/6/cenp, en esta última se obtuvieron los valores espontáneos e inducidos más altos, siendo menos eficiente y sensible al daño determinado por esta técnica citogenética.¹²

Por otro lado en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se obtuvo que la línea más eficiente fue la Balb/c.^{5,8,15} Esta línea difirió de forma significativa de las demás evaluadas, obteniéndose los valores más altos de concentración espermática espontánea como índice de citotoxicidad y los valores más bajos de anomalías en la cabeza del espermatozoide como indicador de daño genotóxico.^{5, 8,15,16} De igual forma fue la línea que mejor respondió al mutágeno evaluado.^{8,17,18} Estos resultados demuestran que genéticamente la línea de ratones Balb/c en ambos sexos es más estable que las otras evaluadas, siendo el biomodelo ideal para los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad *in vivo*, ya que permite detectar en un estrecho margen de error aquellas sustancias que sean clasificadas de muy baja genotoxicidad.

De igual forma fueron evaluadas las líneas de ratas Sprague Dawley, Lewis y Wistar de ambos sexos en los ensayos antes mencionados. Los animales utilizados en este estudio fueron adultos jóvenes de 6-8 semanas, cuyo peso corporal oscilaba entre 180-210 g.

Se observó menor número de daño al ADN basal en la línea de ratas SD en ambos sexos al ser evaluadas en el ensayo cometa alcalino de células individuales.¹⁹⁻²² Los resultados de inducción obtenidos con la CF no difirieron entre líneas, resultado que estuvo de manifiesto en ambos sexos.

El menor resultado basal de citotoxicidad dado por la relación eritrocitos

policromáticos/eritrocitos normocromáticos se obtuvo en la línea de ratas SD en ambos sexos.²³⁻²⁵ Igualmente la respuesta de esta línea de rata a la CF fue alta, pero menor a los resultados de clastogenicidad obtenidos en las líneas Lewis y Wistar en ambos sexos; lográndose su mayor efecto clastogénico por la alta formación de micronúcleos en el sexo machos de la línea Wistar. Las ratas SD en ambos sexos difirieron significativamente con las demás líneas evaluadas en el ensayo de aberraciones cromosómicas; obteniéndose los resultados basales más bajos de células con aberraciones.^{23,26} Pero el mayor efecto de la CF se logro en la línea de ratas Lewis.

Las ratas SD machos superaron a las demás líneas evaluadas en cuanto el número de espermatozoides normales de forma basal. De las otras dos líneas evaluadas la que mayores resultados de espermatozoides anómalos basales obtuvo fue la Lewis. La CF indujo mayor número de cabezas anómalas en la línea de ratas Lewis.^{25,27}

El hecho de que ratas SD difirieran de forma significativa en las variables de daño medidas por estos cuatro ensayos con las otras dos líneas evaluadas, reporta una gran utilidad, ya que las ratas SD constituye una línea heterogénea, con respuesta muy similar a la de las poblaciones humanas, justificando su uso en la mayoría de los estudios farmacológicos y toxicológicos preclínicos.²⁷⁻²⁹

Una vez seleccionados los mejores biomodelos de ratón y rata realizamos una comparación teniendo en cuenta la respuesta de ambas especies murinas entre las tasas endógenas e inducidas con CF en las cuatro técnicas citogenéticas mencionadas con anterioridad.

El ensayo cometa arrojó que el mejor biomodelo en ambos sexos fueron las ratas SD difiriendo significativamente con los resultados obtenidos en ratones Balb/c teniendo en cuenta los valores espontáneos e inducidos de daño al ADN.³⁰

En el ensayo de micronúcleos el biomodelo ideal fue el ratón Balb/c, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF.³¹ Por su parte en el ensayo de aberraciones cromosómicas el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones Balb/c, experimentado un menor número de células con

aberraciones, pero las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, induciendo mayor número de aberraciones cromosómicas.³¹

Al comparar los resultados basales e inducidos en la morfología de la cabeza del espermatozoide entre ambas especies se obtuvo que la línea de ratones Balb/c difiere con las ratas SD, obteniéndose en esta línea de ratones los valores espontáneos más bajos en cuanto al análisis de las variables genotóxicas, experimentando mayor concentración espermática que las ratas SD.³² Al analizar la morfología de la cabeza del espermatozoide los ratones Balb/c son más susceptibles a la CF, pero al medir la citotoxicidad mediante la concentración espermática resultaron ser más resistentes al daño inducido por la CF que las ratas SD.³²

Las diferencias encontradas en cuanto a la expresión del daño genotóxico causado por la CF pudiera ser en respuesta a diferentes niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima citocromo P-4501A1 en el hígado, ya que los ratones y ratas difieren genética y epigenéticamente al tener en cuenta esta enzima hepática fundamental en la fase I del metabolismo de xenobióticos, que participa en el metabolismo de la CF en el hígado al utilizarse como droga citotástica.³³

Conclusiones

En todos los ensayos realizados la línea de ratones Balb/c resultó ser el biomodelo ideal, encontrándose los índices espontáneos más bajos e inducidos altos al mutágeno utilizado. Estos resultados demuestran que genéticamente la línea de ratones Balb/c en ambos sexos es más estable que las otras evaluadas.

Referencias

1. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel 2009; 23:23-40.
2. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A. The mice as ideal biomodel in the genotoxicity assays, Finlay Institute, Cuba. Revista Salud Animal 2011; 33:1-15.
3. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel 2009; 25:22-38.
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; 26:1-12.
5. 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; 26:13-35.
6. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y. Daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino. Biotecnología Aplicada 2011; 28:18-29.
7. 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; 4:38-9.
8. 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; 24:7-29.
9. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos. Retel 2010; 31:21-31.
10. Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. VaccMonitor 2011; 20:28-33.

- 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; 23:8-22.
- 12.** 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; 44:503-511.
- 13.** Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, Goicochea E. Efectos del D-003, mezcla de Ácidos Alifáticos en el ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vivo*. Revista Cubana de Farmacia 2010; 44:213-220.
- 14.** Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D. Comparación de la respuesta de ratones Balb/c de Ambos sexos a la administración de dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Revista Veterinaria Argentina 2010; 27:1-10.
- 15.** 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; 20:2-14.
- 16.** Arencibia DF. Spontaneous and induced frequency of anomalies in the head sperm morphology in NMRI mice. Toxicology Letters 2010; 196:156-157.
- 17.** Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. Rev. CENIC 2009; 40:29-32.
- 18.** Arencibia DF, Rosario LA. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. REDVET 2011; 12:1-13.
- 19.** Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Cometa. ARS Pharmaceutica 2010; 5:149-56.
- 20.** Vidal A, Arencibia DF, Rosario LA. Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means

- of the comet assay. *VacciMonitor* 2010; 19:243.
- 21.** Moreno D, Arencibia DF, Rosario LA. Evaluation of Sprague Dawley rat as biomodel in two antigenotoxicity assays. *VacciMonitor* 2010; 19:246.
 - 22.** Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE. Respuesta de ratas Sprague Dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica. *Retel* 2010; 30:21-35.
 - 23.** Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Revista Veterinaria Argentina* 2010; 27:1-13.
 - 24.** Arencibia DF, Rosario LA. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Retel* 2010; 29:1-15.
 - 25.** Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Evaluación y comparación entre tres líneas de ratas como biomodelos en cuatro ensayos de genotoxicidad. *Retel* 2011, 35:16-24.
 - 26.** Arencibia DF, Rosario LA. Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Retel* 2010; 28:1-14.
 - 27.** Arencibia DF, Rosario LA. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *THEORIA* 2009; 18:7-13.
 - 28.** Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*. *Revista de Toxicología* 2009; 26:127-130.
 - 29.** Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Delgado L. Comparación de la respuesta de ratas Sprague Dawley frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *ARS Pharmaceutica* 2010; 51:155-162.
 - 30.** Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Comparación de dos biomodelos

- (ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley) en el ensayo cometa alcalino. *Biocyt* 2011; 4:229-239.
- 31.** Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Química Viva* 2011; 10(2).
- 32.** Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *VacciMonitor* 2011; 20(3).
- 33.** Amri H, Batt A, Siest G. Comparison of cytochrome P-450 content and activities in liver microsomes of seven species including man. *Xenobiotica* 1986; 16:351-358.

Recibido: 13/06/11

Aceptado: 17/06/11