



ASSESSMENT AND COMPARISON OF FOUR MICE BREEDS AS BIOMODEL IN GENOTOXICITY ASSAYS

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE CUATRO LÍNEAS DE RATONES COMO BIOMODELO EN ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

^{1,1}Daniel Francisco Arencibia Arrebola, ^{2,2}Luis Alfredo Rosario Fernández,
^{3,3}Yolanda Emilia Suárez Fernández y ^{4,4}Alexis Vidal Novoa

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.

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

⁴Departamento de Bioquímica y Toxicología, Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, Cuba.

Generalmente los estudios mutagénicos y genotóxicos en toxicología experimental se realizan después de la evaluación de toxicidad aguda potencial a evaluar en dos especies y al menos en dos vías de administración de manera independiente (Gámez y Más, 2007). Con estos ensayos se explora el riesgo asociado a daños directos o indirectos sobre el material genético donde una respuesta positiva permite por lo general el paso del compuesto a un segundo nivel de evaluación (Arencibia et al., 2009).

En la actualidad se ha descrito una amplia gama de ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* capaces de detectar el daño genotóxico a nivel de la estructura primaria del ADN, genes, cromosomas y por último la célula como unidad estructural y funcional. En este sentido las agencias reguladoras a su vez han elaborado protocolos estrictos para la realización de los mismos y sugieren cuál o cuáles de ellos utilizar en cada momento, apoyándose sobre todo en los ensayos *in vivo* (OECD, 2009). 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 en semejanza con los humanos. El grupo de mamíferos más utilizado ha sido el de los roedores y dentro de este los ratones (Arencibia et al., 2009a).

Correspondence to author

1. darencibia@finlay.edu.cu 2. lrosario@ifal.uh.cu

3. dnsive@infomed.sld.cu 4. alexis.vidal@infomed.sld.cu

Manuscrito recibido el 31 de marzo de 2011, aceptado el 18 de mayo de 2011.

El principal problema radica en que los investigadores utilizan las diferentes líneas genéticas existentes del biomodelo de forma azarosa o por conveniencia, pero en la generalidad de los casos esta decisión está lejos de un sustento científico teórico-práctico que justifique la selección. Condicionado fundamentalmente por la falta de estudios al respecto; esto conduce a que en la mayoría de los casos los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación que trabajan compuestos semejantes o del mismo grupo en diferentes momentos no puedan ser comparables debido a diferencias epigenéticas en la expresión de los daños a nivel del genoma entre las líneas del biomodelo (Arencibia et al., 2010; Arencibia et al., 2010a), permitiendo que no sean reveladas las verdaderas potencialidades genotóxicas del compuesto a evaluar. Esto ocurre debido a que el biomodelo tiene una baja tasa de expresión del daño genotóxico y por ello un mayor margen de error a la hora de emitir un criterio de seguridad del compuesto evaluado.

Esta problemática conduce a pensar entonces que en la actualidad sólo aquellas sustancias consideradas como seguras o altamente genotóxicas cuentan con una clasificación verdadera, mientras que aquellas capaces de causar “pequeños” daños no están debidamente clasificadas.

Debido a lo anterior ha surgido la necesidad de realizar estudios comparativos mediante las tasas espontáneas e inducidas con ciclofosfamida (CF) de daños al ADN en diferentes líneas de ratones disponibles en Cuba (Balb/c, NMRI, OF-1 y C57/BL6/cenp de ambos sexos) en los diferentes niveles de expresión.

El primer nivel lo constituye la estructura primaria del ADN evaluado mediante la electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa en sangre periférica). El segundo nivel representado por el ensayo de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea, los cuales permiten evaluar el daño a los cromosomas. Por último el daño al nivel celular mediante la morfología de la cabeza del espermatozoide (Gámez y Más, 2007).

Cabe resaltar que en los estudios de esta índole se trabaja con ratones sensibles a sustancias mutagénicas reconocidas; esta línea de ratones es considerada como línea más eficiente, puesto que manifestará menor daño endógeno y un daño inducido aceptable.

Los resultados de la presente investigación permitirán que los especialistas dedicados a esta rama cuenten con una herramienta potente, avalada estadísticamente en el momento de seleccionar la línea genética de ratones para realizar estudios de mutagénesis y carcinogénesis.

Los resultados mostrados también servirán para disminuir considerablemente el costo total de los ensayos de toxicogenética. Desde el punto de vista científico permitirán una evaluación objetiva del potencial genotóxico de los compuestos a evaluar, lo que conllevará a resguardar la seguridad del paciente o consumidor; también contribuirán desde el punto de vista bioético a impulsar diseños racionales de los experimentos y la disminución en el número de animales de experimentación, cumpliendo de esta forma con el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento) planteado por las sociedades protectoras del bienestar animal y las directivas de las agencias reguladoras de medicamentos tales como la EMEA, ICH y OECD (EMEA, 2001; ICH, 2008; OECD, 2009).

PROCEDIMIENTOS

Organismos y ensayos

Fueron utilizados ratones adultos jóvenes (de ambos sexos) de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57/BL6/cenp; de ocho y nueve semanas de edad, con peso promedio de 28 ± 2 g. Los organismos se mantuvieron en cajas de polietileno con tapa de reja inoxidable. Ubicados en lotes de cinco animales por caja/sexo/grupo experimental. La temperatura del local fue de $23 \pm 2.5^\circ$ C y humedad relativa de 60 ± 5 % y fotoperiodo de 12 h. El acceso al agua y alimento fue *ad libitum* (Arencibia et al., 2010f).

Todos los organismos fueron alimentados con pienso esterilizado todo propósito, suministrado por el Centro de Producción de Animales de Laboratorios de la República de Cuba (CENPALAB).

Los ensayos realizados fueron la electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa) en células de sangre periférica, ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea, ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de epidídimos; según técnicas modificadas y estandarizadas por Arencibia et al., (2009a) y Arencibia y Rosario (2010).

Variables analizadas

-Porcentaje de leucocitos en sangre periférica según nivel de daño al ADN de 0-4:

*Grado 0 (células no dañadas).

*Grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN).

*Grado 2 (daño bajo, con frecuencia baja de lesiones en el ADN).

*Grado 3 (daño alto, con frecuencia alta de lesiones en el ADN).

*Grado 4 (células totalmente dañadas).

- Número de eritrocitos policromáticos en médula ósea con micronúcleos y el índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos adultos).

- Total de células con aberraciones estructurales en los cromosomas y en las cromátides, índice mitótico (número de células que se encontraban en la fase de división celular de metafase) y células con poliploidía.

- Concentración espermática en epidídimos, frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides anómalas en forma de banana, amorfas, sin ganchos y con dos colas.

Grupos Experimentales

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administró en el horario de 10:30-11:30 y las concentraciones de cada producto se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal (Arencibia et al., 2009b).

Los organismos se distribuyeron aleatoriamente (cinco ratones/grupo/sexo/ensayo),

en cada una de las tres réplicas realizadas para un total de 15 ratones/grupo/sexo/ensayo. Dado el alto costo de los reactivos y del montaje de la técnica para el caso del ensayo cometa solo se realizaron dos réplicas para un total de 10 ratones/grupo/sexo.

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

En el grupo experimental 2 (control vehículo 1) se utilizó el Tween 65 al 2%, siendo repostado como el vehículo más utilizado en la preparación de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo.

En el grupo experimental 3 (control vehículo 2) se utilizó NaCl al 0,9%, ya que está demostrado que este producto es el disolvente de la mayoría de las sustancias hidrofílicas que se preparan en nuestros laboratorios.

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) (Arencibia et al., 2009c). Preparándose 2h antes de la administración (Arencibia et al., 2009a).

Se utilizaron tres grupos controles para analizar una n mayor y asegurar veracidad y confiabilidad de los datos.

En el grupo experimental 4 se utilizó como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal. La CF fue diluida en (NaCl) al 0,9%; administrándose inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes de la eutanasia programada (Arencibia et al., 2009d; Arencibia et al., 2011). Para el caso del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide los ratones machos se administraron con CF durante 5 días consecutivos y luego se les practico la eutanasia 30 días posteriores a la última inoculación con el fin de que los espermatozoides analizados fueran los que estuvieron expuestos al mutágeno (Arencibia et al., 2009c; Arencibia et al., 2009e; Arencibia et al., 2009f).

RESULTADOS

La comparación de los porcentajes 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 (Arencibia et al., 2010d). El porcentaje de nucleoides con grado 0 de daño en ratones Balb/c se encontró con valores entre 49.97 y 57.47% en ambos sexos, en las demás líneas evaluadas estos valores fueron menores difiriendo significativamente con la línea antes mencionada ($p \leq 0.05$, test U de Mann Whitney).

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 (Arencibia et al., 2009b; Arencibia et al., 2009f; Arencibia et al., 2010c; Arencibia et al., 2011). En esta línea de ratón se obtuvieron índices espontáneos del porcentaje de eritrocitos policromáticos que van desde 0.13 a 0.18% en ambos sexos. Del mismo modo la CF indujo en ambos sexos altos porcentajes con valores entre 1.65 y 1.82%. Cabe destacar que los valores del porcentaje de eritrocitos policromáticos espontáneos en las otras líneas evaluadas fueron mayores y difirieron significativamente con los obtenidos en ratones Balb/c para una ($p \leq 0.05$, test de ANOVA). Por solo citar a la línea C57/BL6/cenp en la cual el porcentaje de eritrocitos policromáticos espontáneos estuvo en ambos sexos en el rango entre 0.20 y 0.25%, en cambio los valores de daño inducidos con el uso de la CF estuvieron entre 1.73 y 2.59%.

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 observaron diferencias significativas entre la línea Balb/c en ambos sexos con las otras líneas evaluadas; por el hecho de presentar los índices espontáneos más bajos e inducidos intermedios (Arencibia et al., 2009d; Arencibia et al., 2010; Arencibia et al., 2010a; Arencibia et al., 2010e). El número total de células con aberraciones en la línea de ratones Balb/c estuvieron entre 7 y 10 en ambos sexos, en tanto la CF indujo entre 175 y 192 células totales con aberraciones de tipo cromosómica. Los resultados obtenidos en las demás líneas fueron mayores para el número de células con aberraciones endógenas y menores para las inducidas. La línea de ratones OF-1 también difirió de forma significativa ($p \leq 0.01$, test no paramétrico de Chi Cuadrado), 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 (Arencibia et al., 2010).

En el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se observó que la línea más eficiente fue la Balb/c (Arencibia et al., 2009c; Arencibia et al., 2009f; Arencibia et al., 2010b). 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 para una ($p \leq 0.05$, test de ANOVA) (Arencibia et al., 2009c; Arencibia et al., 2009f; Arencibia, 2010; Arencibia et al., 2010b). Se obtuvo en ratones machos Balb/c un total de cabezas normales con valores entre 483.2 y 489.3 en 500 células registradas, en cambio la CF provocó una disminución significativa con valores entre 387.2 y 411.8, siendo la línea que mejor respondió al mutágeno evaluado (Arencibia et al., 2009e; Arencibia et al., 2009f; Arencibia y Rosario, 2011).

Por otro lado, en la línea C57/BL6/cenp se encontraron las tasas de daño espontánea e inducidas más altas (Arencibia et al., 2010b), manifestando una alta sensibilidad a compuestos que inducen una alta tasa de daño al ADN.

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. Esto permite sugerir que esta línea de ratón sea empleada en los ensayos realizados, puesto que se logra mayor sensibilidad y robustez en cada una de las pruebas utilizadas.

REFERENCIAS

- 1.- Arencibia, D.F., 2010. Spontaneous and induced frequency of anomalies in the head sperm morphology in NMRI mice. *Toxicology Letters*, 196(Supplement 1): 156-157.
- 2.- Arencibia, D.F. y L.A. Rosario, 2011. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET*, 12(2): 1-13.
- 3.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, J. Morffi y D. Curveco, 2009. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel*, 23(3): 23-40.
- 4.- Arencibia, D.F., R. Gámez, A. Gutiérrez, B. Pardo, M. Noa, R. Más, D. Curveco, H. García y E. Goicochea, 2009e. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en Ratones OF-1. *Revista CENIC*, 40(1): 29-32.
- 5.- Arencibia, D.F. y L.A. Rosario, 2010. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa in vivo en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Retel*, 26(1): 1-12.
- 6.- Arencibia, D.F., A. Gutiérrez, R. Gámez, B. Pardo, D. Curveco y H. García, 2009b. 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*, 43(2): 8-9.
- 7.- Arencibia, D.F., A. Vidal, L.A. Rosario, Y.E. Suárez y L. Delgado, 2011. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*, 20(1): 28-33.
- 8.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y D. Curveco, 2009c. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *Retel*, 20(1): 2-14.
- 9.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y D. Curveco, 2010e. 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*, 27(269): 1-10.
- 10.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y Y. Rodríguez, 2010. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. *Revista Cubana Farmacia*, 44(4): 503-511.
- 11.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y Y. Rodríguez, 2010d. Daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino. *Biotecnología Aplicada*, 28(1): 18-29.
- 12.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, J. Morffi y D. Curveco, 2009a. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*, 25(3): 22-38.
- 13.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Hernández y D. Curveco, 2010b. Evaluación de la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelo experimental en tres ensayos de genotoxicidad potencial. *Retel*, 26(2): 13-35.
- 14.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Rodríguez, Y. López y D. Díaz, 2009d. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb/c de ambos sexos. *Retel*, 23(2): 8-22.

- 15.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y. Rodríguez, Y. Martín y D. Díaz, 2009f. 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*, 24(2): 7-29.
- 16.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y.E. Suárez y Y. Soroa, 2010f. Consideraciones importantes acerca de la cuarentena de ratas y ratones como biomodelos experimentales en toxicología. *Revista Veterinaria Argentina*, 27(271): 1-23.
- 17.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario, Y.E. Suárez y L. Delgado, 2010c. El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos. *Retel*, 31(3): 21-31.
- 18.- Arencibia, D.F., R. Gámez, A. Gutiérrez, R. Más, B. Pardo, H. García y E. Goicochea, 2010a. Efectos del D-003, mezcla de Ácidos Alifáticos en el ensayo de Aberraciones Cromosómicas in vivo. *Revista Cubana Farmacia*, 44(2): 213-220.
- 19.- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). 2001. Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccine. London. (CPMP/SWP/997/96). UK. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/099796en.pdf> (accesado en diciembre 16, 2010).
- 20.- Gámez, R. y R. Más, 2007. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. *Revista CENIC*, 38(3): 204-208.
- 21.- ICH (International Conference on Harmonization). 2008. Regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals of human use. <http://www.fda.gov/regulatoryguidancesectiongenotox.pdf> (accesado en febrero 9, 2011).
- 22.- OECD (Organization for the Economy, Cooperation and Development). 2009. Genetic Toxicology: (Annual Report 2009). Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions. <http://www.oecd.org/bookshop> (accesado en junio 24, 2010).