

ARTÍCULOS ORIGINALES

Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp**Comparison between induced and spontaneous chromosomal aberrations in OF-1 and C57BL/6/cenp bone marrow mice**

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^I; Luis Alfredo Rosario Fernández^{II}; Yanet Hernández Rodríguez^{III}

^IDoctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Aspirante a Investigador. Instituto Finlay. La Habana, Cuba.

^{II}Licenciado en Microbiología. Instructor. Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL). La Habana, Cuba.

^{III}Técnico Medio en Farmacia Industrial. IFAL. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El ensayo citogenético in vivo es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales in vivo. El objetivo del trabajo consistió en determinar el biomodelo experimental más eficiente en este ensayo mediante la comparación de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea, en uno y otro sexos de 2 líneas de ratones (OF-1 y C-57BL/6/cenp). Se formaron 4 grupos experimentales, uno control negativo, dos tratados durante 14 días con sustancias vehículos por vía oral, NaCl (0,9 %) y tween 65 (2 %), y uno control positivo tratado a las 48 y 24 h antes del sacrificio con ciclofosfamida (50 mg/kg) por vía intraperitoneal. La línea de ratones OF-1 resultó tener una frecuencia espontánea más baja en las variables analizadas que la C-57BL/6/cenp, obteniéndose un menor número espontáneo de células totales con aberraciones y mayor sensibilidad a la ciclofosfamida que la línea C-57BL/6/cenp. Se concluye que los ratones OF-1 y C-57BL/6/cenp, constituyen buenos modelos a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de aberraciones

cromosómicas estructurales y numéricas analizadas aunque se recomienda el uso de la línea OF-1.

Palabras clave: Frecuencia espontánea, frecuencia inducida, aberraciones cromosómicas, ratones OF-1, ratones C-57BL/6/cenp, ciclofosfamida, médula ósea.

ABSTRACT

The in vivo cytogenetics array is a very sensible short term mutagenesis method useful to detect mainly the in vivo the structural chromosomal aberrations. The aim of present paper was to determine the more effective experimental bio-model in this type of model to compare the spontaneous and induced frequency of the above mentioned aberrations in bone marrow cells in both sexes of two mice species (OF-1 and C-57BL/6/cenp). Four experimental groups were designed, one of negative control, twotreated during 14 days using oral vehicle substancesm NaCl (0.9 %) and tween 65 (2 %) and one of positive control treated at 48 and 24 h before sacrifice using cyclophosphamide (50 mg/kg) by intraperitoneal route. The OF-1 mice species had the lowest spontaneous frequency in variables analyzed that the C-57BL6/cenp species, achieving a lower spontaneous number of total cells with aberrations and a great sensitivity to cyclophosphamide than the C-57BL/6/cenp species. We conclude that the OF-1 and C-57BL/6/cenp mice were good models to be used in genotoxicological studies due to the low spontaneous frequency of the above mentioned aberrations and the numerical ones analyzed, thus it is recommended the use of OF-1 species.

Key words: Spontaneous frequency, induced frequency, chromosomal aberrations, OF-1 mice, C-57BL/6/cenp mice, Cyclophosphamide, bone marrow.

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son los vehículos de la herencia en los organismos superiores. Si bien los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies por las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes, estos pueden originar también considerables repercusiones como la pérdida de la viabilidad celular, cambios fenotípicos en el organismo o en la descendencia, retardo mental, malformaciones congénitas, infertilidad y cáncer como se observa en la especie humana.^{1,2} Es bien conocida la relación entre la exposición a sustancias genotóxicas, ya sea de forma ocupacional, accidental o por estilos de vida (hábitos), y el incremento del riesgo de padecer cáncer.³

El ensayo citogenético in vivo es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales (AC) en condiciones que involucran la respuesta in vivo, y que pueden variar según la especie y el tejido. La mayor parte de las aberraciones inducidas por mutágenos químicos son de tipo cromatídico.

La ocurrencia de AC generalmente se evalúa durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento.^{4,5} En este ensayo se utilizan células de médula ósea de roedores expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. El tejido diana es la médula ósea por estar más vascularizado y por contener una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad.⁶ Antes de sacrificarlos, se trata a los animales por medio de sustancias como la colchicina, que actúan como inhibidores del huso, con el fin de acumular las células en una fase de mitosis del tipo metafásico (c-metáfase). A partir de las células se efectúan preparaciones de cromosomas secadas al aire y, después teñidas; a continuación se analizan las metafases en el microscopio para observar las aberraciones cromosómicas.⁷

Es de vital importancia en la evaluación genotoxicológica el uso de biomodelos experimentales eficientes, que expresen la menor frecuencia de aberraciones espontáneas, tanto estructurales como numéricas, para poder detectar, con el mínimo margen de error, la actividad clastogénica de una sustancia química o agente complejo.

El objetivo del presente trabajo es, por tanto, determinar el biomodelo experimental más eficiente entre las líneas de ratones OF-1 y C-57BL/6/cenp de uno y otro sexos mediante la comparación de la frecuencia espontánea e inducida de AC en células de la médula ósea.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones adultos jóvenes (5-7 semanas), de uno y otro sexos, de las líneas OF-1 y C-57BL/6/cenp procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-28 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 25 ± 1 °C, la humedad entre 60 ± 5 % y los ciclos de luz- oscuridad fueron de 12 h. El alimento que se les administró a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue ad libitum.

Grupos experimentales incluidos

Todos los grupos experimentales se administraron en el horario de 10:30-11:30 a.m. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo), quedando los grupos constituidos por 10 ratones/grupo en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 20 ratones/grupo, 10 hembras y 10 machos en las 2 líneas evaluadas ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Grupos experimentales en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* en ratones OF-1 y C-57BL/6/cenp de uno y otro sexos para las 2 réplicas

Grupos experimentales	Línea de ratón	No. total de animales	Sustancia a administrar	Vía de administración	Vol. máx. a administrar (mL/kg)
Control negativo	(OF-1)	20	No tratado	Oral (simulacro)	-
Sustancia vehículo 1	(OF-1)	20	(Tween 65, al 2 %)	Oral	2
Sustancia vehículo 2	(OF-1)	20	(NaCl 0,9 %)	Oral	2
Control positivo	(OF-1)	20	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15
Control negativo	(C-57BL/6/cenp)	20	No tratado	Oral (simulacro)	-
Sustancia vehículo 1	(C-57BL/6/cenp)	20	(Tween 65, al 2 %)	Oral	2
Sustancia vehículo 2	(C-57BL/6/cenp)	20	(NaCl 0,9 %)	Oral	2
Control positivo	(C-57BL/6/cenp)	20	(Ciclofosfamida, 50 mg/kg)	i.p	15

En el grupo experimental 1 se utilizaron 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 que los demás grupos, durante un periodo de 14 días.

En el grupo experimental 2 se trató con tween 65 al 2 % (vehículo 1, SV1), el cual es un vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo.⁸⁻¹⁰ En el grupo experimental 3 se utilizó el NaCl al 0,9 % (vehículo 2, SV2), disolvente de la mayoría de las sustancias hidrofílicas.^{4,7,11} Ambas sustancias fueron administradas por vía oral durante un periodo de 14 días, preparadas 2 h antes de la administración.

En el grupo experimental 4 se utilizó la ciclofosfamida (CF, Lemri, S.A., 50 mg/kg) como control positivo por vía intraperitoneal. La CF se diluyó en salina al 0,9 %.^{7,11} La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada en dos inoculaciones separadas 24 h.^{11,12}

Observaciones clínicas

Se realizaron 2 observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y entre las 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. El grupo experimental 4, tratado con CF, se sacrificó 24 h después de la segunda administración.¹³ Se hicieron coincidir el día del sacrificio de todos los grupos en cada una de las réplicas realizadas.

Ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo

Cuatro horas antes del sacrificio, la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (4 mg/kg, vía i.p.). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCl (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 min. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 30-35 min. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos.^{11,14} También se calculó el índice mitótico, IM (porcentaje de metafases en 1 000 células registrables), así como el número de células con poliploidía en 1 000 células registrables igualmente, todas las laminillas (o preparaciones) fueron leídas por 2 observadores, para luego establecer un promedio entre las lecturas.¹⁴

Análisis estadístico

Las variables continuas se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y las categóricas mediante la prueba de homogeneidad (chi cuadrado). El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (Data Analysis Software System), versión 6. www.statsoft.com.

RESULTADOS

Durante los 14 días de administración en los animales del grupo control negativo, sustancia vehículo 1 y 2 en ambas líneas de ratones, no se encontraron signos y síntomas de toxicidad. Igualmente, en ambas líneas tampoco se observaron signos y síntomas de toxicidad frente a la CF.¹⁵ En cuanto a las AC estructurales no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control negativo y las sustancias vehículos 1 y 2. En las variables índice mitótico y el número de células con poliploidía tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control negativo y las sustancias solventes 1 y 2.

Los resultados obtenidos en los animales tratados con CF ([tabla 2](#)) fueron estadísticamente diferentes a los de los controles negativos y a los de los solventes 1 y 2 en cuanto a las AC de tipo estructural y numérico.

Tabla 2. Resultados del promedio en las 2 réplicas experimentales de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómica en médula ósea de ratones OF-1 y C-57BL/6/cgmp, de uno y otro sexos

Tratamiento	IM (%) ^a	Células con poliploidía ^b	Gaps ^c	Aberraciones/1 000 células/grupo ^d				No. de células con aberraciones
				Cromosómicas		Cromatídicas		
				Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
Ratones OF-1 machos								
CN	5,42 ± 0,31	2	7	0	0	10	3	13
CF	3,27 ± 0,40*	19**	55**	11**	29**	169**	30**	239**
SV-1	5,20 ± 0,56	1	8	0	0	11	4	15
SV-2	5,71 ± 0,20	1	5	0	0	12	2	14
Ratones OF-1 hembras								
CN	5,66 ± 0,42	0	9	0	0	9	7	16
CF	3,38 ± 0,35*	22**	58**	10**	33**	178**	32**	253**
SV-1	5,46 ± 0,30	1	8	0	0	11	3	14
SV-2	4,99 ± 0,18	1	6	0	0	8	4	12
Ratones C-57BL/6/cgmp machos								
CN	5,82 ± 0,95c	2	10c	0	0	12	5	17c
CF	3,46 ± 0,29*	21**	60**	17**c	34**	174**c	29**	254**c
SV-1	5,20 ± 0,28	0	9	0	0	13	3	16
SV-2	5,59 ± 0,33c	3c	11c	0	0	14	2	16
Ratones C-57BL/6/cgmp hembras								
CN	5,21 ± 0,71c	3c	8	0	0	13	5	18
CF	4,01 ± 0,09*c	23**	63**c	14**	36**	187**c	34**	271**c
SV-1	4,96 ± 0,11c	0	13c	0	0	10	4	14
SV-2	5,03 ± 0,25	1	12c	0	0	9	7c	16c

^a Media ± DE, de un total de 10 000 células/grupo/réplica para un total de 20 000 células evaluadas; *p < 0,05; ANOVA; **p < 0,01; prueba no paramétrica χ^2 . Comparación contra el control negativo para ambas pruebas.
^c: comparación de mediciones que difieren entre líneas de ratones; CN: control negativo; CF: ciclofosfamida 50 mg/kg i.p.; SV-1: sustancia vehículo 1; SV-2: sustancia vehículo 2.

Al comparar los resultados estadísticos entre líneas de ratones para el mismo sexo tal como se aprecia en la tabla 2, difieren significativamente en las variables tales como índice mitótico, número de células con poliploidía, gaps, rupturas cromosómicas, rupturas e intercambios cromatídicos, así como el número de células con aberraciones, encontrándose estas marcadas diferencias tanto en la frecuencia espontánea como inducida.

DISCUSIÓN

En este estudio se incluyeron animales tratados con dos sustancias vehículo, las cuales son utilizadas en la mayoría de las preparaciones tanto de productos naturales como químicos, además, una de ellas constituye el solvente del control positivo utilizado. Se decidió incluir estos grupos para analizar un mayor número de animales controles y por encontrarse estas sustancias reflejadas en la mayoría de las investigaciones que en nuestros días se realizan como controles negativos, gracias a su probada inocuidad.

En la tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en ambas líneas de ratones. Se pudo constatar que bajo nuestras condiciones experimentales la línea OF-1 es

más eficiente para este ensayo que la C-57BL/6/cenp, ya que la primera mostró resultados espontáneos en el rango de 12-16 células totales con aberraciones y la C-57BL/6/cenp estuvo en el rango de 14-18. Esto concuerda con otros autores que plantean que para el caso de esta especie se pueden encontrar una frecuencia espontánea de 0-3 % células con aberraciones en 1 000 células registrables.¹⁶ Bajo nuestras condiciones experimentales el número de células con poliploidías en la línea OF-1 se encuentra como promedio entre 0-2 en 1 000 células registrables, mientras que en la línea C-57BL/6/cenp está en el rango de 0-3. El índice mitótico para el caso de la línea OF-1 se encuentra en valores promedios de $4,99 \pm 0,18$ a $5,71 \pm 0,20$ % y en la línea C-57BL/6/cenp los valores van desde $4,96 \pm 0,11$ a $5,82 \pm 0,95$ %. Los resultados de la frecuencia espontánea difieren significativamente entre líneas para el mismo sexo, tanto en las aberraciones de tipo numéricas como estructurales.

En tanto, la CF indujo, como promedio, 239-253 células totales con AC estructurales en 1 000 células registrables en la línea OF-1, en uno y otro sexos, y 254-271 en la línea C-57BL/6/cenp (tabla 2). Estos resultados difieren estadísticamente entre líneas para el mismo sexo, lo que demuestra que los ratones C-57BL/6/cenp son más susceptibles a la CF que los OF-1. Teniendo en cuenta las aberraciones de tipo numérico, la CF disminuyó considerablemente el índice mitótico dada su acción como antineoplásico citotóxico.^{12,17} Se registraron valores promedios de índice mitótico estadísticamente significativos al comparar los resultados entre líneas, donde se obtuvo en la línea OF-1 valores entre $3,27 \pm 0,40$ a $3,38 \pm 0,35$ % y en la línea C-57BL/6/cenp entre $3,46 \pm 0,29$ a $4,01 \pm 0,09$ %. En cuanto al número de células con poliploidía indujo como promedio en la línea OF-1 valores que oscilan entre 19-22 en 1 000 células registrables y en la línea C-57BL/6/cenp valores que oscilan entre 21-23 células con poliploidía como promedio en 1 000 células registrables, lo cual manifiesta que la CF es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular.^{12,13,15}

Estos resultados nos permiten afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales, la línea de ratones OF-1 es más eficiente para ser utilizada en este ensayo que la C-57BL/6/cenp, por presentar un menor número espontáneo de células totales con aberraciones al compararse con la otra línea analizada, valores que fueron estadísticamente significativos para la mayoría de las variables analizadas. No obstante la línea C-57BL/6/cenp manifestó una ligera tendencia a mayor susceptibilidad a la CF que la línea OF-1. Obtener biomodelos experimentales con estos bajos índices espontáneos, permite detectar de forma más rápida y eficiente la ocurrencia de inducción de aberraciones de un producto a evaluar, lo cual hace a su vez aun más sensible y válida esta prueba.

En conclusión, las líneas de ratón OF-1 y C-57BL/6/cenp, constituyen buenos modelos a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de aberraciones de tipo estructural, el índice mitótico y el número de células con poliploidía, así como su sensibilidad a la acción de la ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) a las 48 y 24 h antes del sacrificio. Además, la línea OF-1 es más eficiente y sensible dada la baja frecuencia en los indicadores que mide esta técnica citogenética, lo que justifica su uso en este ensayo en relación con la línea C-57BL/6/cenp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gurin S. Genética clásica y molecular. Rev Ciencia.com 2004;2:1-27.

2. Verlinskyk Y, Kuliev A. Review of Current status of preimplantation diagnosis for single gene disorders. RBMonline. 2003;7(2):145-50.
3. Au W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. Occup Med. 1991;6(4):597-611.
4. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res. 1999;189:157-65.
5. Sorsa M, Ojajärvi A, Salomaa S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals. Teratogen Carcinogen Mutagen. 1999;10:215-21.
6. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse DG, Bootman J. In Vivo Cytogenetic Assays. In: Kirkland DJ (ed.). Basic Mutagenicity Tests. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised. Melbourne, Sydney: Cambridge University Press; 1990. p.115-41.
7. Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH. Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res. 1994;312:305-12.
8. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. Drugs Exp Clin Res. 2004;30:227-34.
9. Arruzazabala ML, 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;7:233-41.
10. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. Drugs Exptl Clin Rest. 2005;31:193-8.
11. OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OECD TG 475 (Genetic Toxicology: In vivo Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells). Anexo B11. 1997. p. 5-6.
12. 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(2):8-22.
13. Perry CS. Differential toxicities of cyclophosphamide and its Glutathione metabolites to A549 cells. Toxic In vitro. 1995;9(1):21-6.
14. 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.
15. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, et al. Efectos del D-003, mezcla de ácidos alifáticos en el ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo. Rev Cubana Farm. 2010;44(2). Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol_44_2_10/far10210.htm
16. Kramer PJ. Genetic toxicology. The in vitro and in vivo aberration test. J Pharm Pharmacol. 2000;4:395-405.

17. Blanco N, Ramos A, Vizoso A. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. Rev Cubana Plant Med. 2006;11:3-4.

Recibido: 8 de junio de 2010.

Aprobado: 17 de julio de 2010.

Dr. *Daniel Francisco Arencibia Arrebola*. Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 16 017. La Habana, Cuba. Correo electrónico: darencibia@finlay.edu.cu