

## **Evaluación y comparación entre tres líneas de ratas en cuatro ensayos de genotoxicidad.**

**Daniel Francisco Arencibia Arrebola<sup>\*</sup>, Luis Alfredo Rosario Fernández<sup>\*\*</sup>, Yolanda Emilia Suárez Fernández<sup>\*\*\*</sup>, Alexis Vidal Novoa<sup>\*\*\*\*</sup>.**

<sup>\*</sup>Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, La Habana, Cuba. E-mail: [darencibia@finlay.edu.cu](mailto:darencibia@finlay.edu.cu)

<sup>\*\*</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba.

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

<sup>\*\*\*\*</sup>Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

---

## Resumen

En esta carta al editor tuvimos como objetivo dar a conocer nuestros resultados de este estudio al evaluar y comparar en ratas de ambos sexos de las líneas Sprague Dawley, Lewis y Wistar los índices espontáneos e inducidos con ciclofosfamida, mediante el ensayo cometa alcalino, micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. Se obtuvo como resultado que la línea de ratas Sprague Dawley en ambos sexos difiere significativamente con los demás líneas donde se encontraron los índices espontáneos más bajos e inducidos aceptables con el uso de la ciclofosfamida como mutágeno. Este estudio permitirá utilizar la mejor línea de ratas como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad de productos naturales, fármacos, vacunas y otros. Además contribuye a impulsar diseños racionales de los experimentos y con ello a la disminución en el número de animales de experimentación, cumpliendo de esta forma con el principio de las tres "Rs".

**Palabras claves:** Ensayos de genotoxicidad, ratas de ambos sexos, frecuencia espontánea e inducida.

---

**Abstract**

***Assessment and comparison between three lines of rats in four genotoxicity assay.***

The aim of this letter to the editor was to communicate our results of this study when evaluating and to compare the spontaneous and induced indexes with cyclophosphamide in rats of both sexes of Sprague Dawley, Lewis and Wistar lines by means of alkaline comet assay, micronucleus and cromosomal aberrations in bone marrow cells and sperm head morphology assay. We obtained as a result that the Sprague Dawley line in both sexes differs significantly with the other lines where they met lower spontaneous indexes and the highest induced indexes with cyclophosphamide as mutagen. This study will allow to use the best line of rats as biomodelo in genotoxicity and antigenotoxicity assay of natural products, drugs, vaccine and others products. Also to impel rational designs of the experiments and with it to the decrease in the number of experimentation animals, fulfilling this way the principle of the three "R".

**Key words:** Genotoxicity assays, rats of both sexes, spontaneous and induced frequency.

---

## Introducción

En la actualidad se han descrito una amplia gama de ensayos de genotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* capaces de detectar el daño genotóxico a los diferentes niveles de expresión, todos con una alta sensibilidad y especificidad.<sup>1</sup> En este sentido las agencias reguladoras a su vez han elaborado protocolos estrictos para la realización de los mismos y sugieren cual o cuales de ellos utilizar en cada momento, legándole un peso preponderante a los ensayos *in vivo*. 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.<sup>2</sup>

El principal problema al respecto radica en que los investigadores utilizan las diferentes líneas genéticas de 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.<sup>3</sup>

De ahí que en no pocas oportunidades sea necesario repetir un estudio debido a que los controles negativos presentan niveles de daños semejantes a los controles positivos; aunque la peor de las consecuencias es realmente el enmascaramiento de las verdaderas potencialidades genotóxicas del producto a evaluar. Esto ocurre debido a que el biomodelo tiene una muy baja tasa de expresión del daño genotóxico y por ello un mayor margen a la hora de emitir un criterio de producto seguro lo que conduce a aceptar un compuesto seguro cuando realmente no lo sea o por el contrario, cuando el biomodelo tiene una alta tasa de expresión del daño genotóxico y consecuentemente un

menor margen para emitir un criterio de producto seguro que entonces conduciría a desechar un producto seguro por concebirlo como genotóxico.<sup>3</sup>

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 ratas disponibles en nuestro país a los diferentes niveles de expresión y 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 ratas para realizar los estudios de mutagénesis y carcinogénesis.

Por lo cual tuvimos como objetivo de esta carta al editor dar a conocer nuestros resultados de este estudio al evaluar y comparar entre ratas de ambos sexos de las líneas genéticas Sprague Dawley, Lewis y Wistar; teniendo en cuenta su respuesta basal e inducida a sustancias mutagénicas como la ciclofosfamida (CF), en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica, ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas en eritrocitos de medula ósea y en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide de epidídimos.

---

## Contenido

### ***Procedimientos***

Se utilizaron ratas de las líneas genéticas Sprague Dawley, Lewis y Wistar, adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-210 g al término de la cuarentena. Las cuales se administraron a razón de 5 animales/sexo/línea/grupo para un total de 10 animales en las dos réplicas realizadas.

Se formaron 4 grupos experimentales. En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo. A estos animales 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 utilizamos el tween 65 al 2 %, en el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9 %, ambas sustancias fueron administradas por vía oral a 2 ml/kg durante un periodo de 14 días, preparadas 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, (Ledoxina®, Lemri, S.A.), la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %.<sup>9</sup> La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales a las 48 horas y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita a razón de 10 ml/kg.

Hemos de destacar que para el caso del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide utilizamos ratas machos de cada línea evaluada, formando estos mismos grupos experimentales a la dosis y vía mencionada con anterioridad, solo que la administración de cada una de estas sustancias fue durante 5 días consecutivos y luego estuvieron sin administrar 52 días (duración del ciclo espermático de la rata).<sup>1,4</sup>

Luego de finalizado el tiempo de administración se realizó el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales (cometa), ensayo de micronúcleos en médula ósea, ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, a partir de los protocolos estandarizados por

Arencibia y col., 2009 y Arencibia y col., 2010.<sup>4,5</sup>

Se compararon todos los resultados contra el grupo control negativo y entre líneas de ratas para el mismo grupo y sexo.

## **Resultados**

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. Los resultados de inducción obtenidos con la CF no difirieron entre líneas, resultado que estuvo de manifiesto en ambos sexos.

La CF difirió nuevamente con los demás grupos en las tres líneas de ratas evaluadas en el ensayo de micronúcleos. El menor resultado basal de citotoxicidad dado por la relación EP/EN se obtuvo en la línea de ratas SD en ambos sexos. 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. Por otra parte la CF indujo un número considerable de MN en esta línea de ratas pero su mayor efecto clastogénico se logro en la línea de ratas Wistar en el sexo machos.

Los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas, demostraron una vez más el uso de ratas SD como biomodelos más eficientes en los ensayos de genotoxicidad. Nuevamente las variables analizadas teniendo en cuenta aberraciones de tipo estructural y el índice mitótico difirieron entre las ratas SD en ambos sexos al compararse con las líneas Lewis y Wistar. Se obtuvieron los resultados basales más bajos de células con aberraciones en ratas SD. 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. Por otro lado en las tres líneas evaluadas se logro un ambiente genotóxico en las células

germinales con el uso de la CF, obteniéndose mayores resultados de inducción de espermatozoides anómalos en la línea de ratas Lewis.

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.

Este estudio permitirá utilizar las ratas SD como la mejor línea en los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad de productos naturales, fármacos, vacunas y otros. Además conducen definitivamente a una disminución de los costos totales en los ensayos de toxicogenética. De forma bioética contribuye a impulsar diseños racionales de los experimentos y con ello a 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.



---

## Referencias

1. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel 2009; 23(3):23-40.
2. Ferrer M. Estudio del potencial antimutagénico de *Phyllanthus orbicularis*. Departamento de Genética y Microbiología. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona: España, 2002:1-91.
3. 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.
4. 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.
5. 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):1-12.

**Recibido: 11/04/11**

**Aceptado: 29/11/04**