



## **Estudio preliminar de la descripción de la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratones viejos para evaluar genotoxicidad.**

Dalia Lizeth Santos Orozco <sup>a</sup>, Ramos-Ibarra María Luisa <sup>a</sup>, Laura Alejandra Hernández Barajas <sup>a</sup>, Covarrubias Martínez Karen

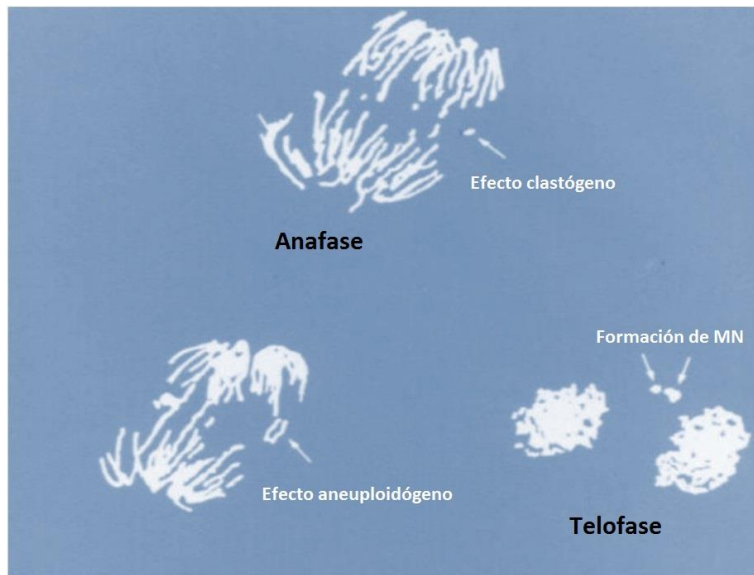
<sup>a</sup> Depto. Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Div. Ciencias Veterinarias, Universidad de Guadalajara., daliabiologia.cucba@gmail.com, maluisaramos@hotmail.com, laherbar@hotmail.com.

### **RESUMEN**

Los ratones son excelentes bioindicadores de genotoxicidad mediante la prueba de micronúcleos. La frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica de ratón adulto (2-3 meses de edad) es de alrededor de  $26,3 \pm 8.7$ ; sin embargo, se desconoce cuál sería la frecuencia de éstos, en ratones viejos por el daño acumulado. Esta información se considera valiosa en trabajos donde se evalúe el efecto genotóxico relacionado al envejecimiento en modelos murinos. Objetivo: determinar la frecuencia de EMN en sangre periférica de ratones mayores a 5 meses de edad. Metodología: Se formaron cinco grupos de ratones de la cepa Balb/C, tanto machos como hembras separados por edades con variaciones de edad entre cada grupo, de uno a dos meses aproximadamente. Se les tomó una gota de sangre periférica cada 7 días durante tres semanas y al momento del muestreo, se realizaron dos frotis por cada organismo. Estás se fijaron y se tiñeron para su análisis, mediante un microscopio de fluorescencia marca Zeiss para obtener las frecuencias de: EMN/10,000 eritrocitos totales (ET y evaluar genotoxicidad);. Se aplicó estadística diferencial y se realizaron comparaciones mediante pruebas paramétricas y no paramétricas con valor de  $p < 0.05$ . Resultados: Los ratones con cinco meses de edad presentaron un promedio de EMN cercana a los adultos, jóvenes ( $28.41 \pm 3.6$ ); mientras que los ratones de 7 y 9 meses fueron de  $40.0 \pm 7.6$  y  $60.54 \pm 10.3$  respectivamente; mostrando un incremento a través del tiempo como era de esperarse. Conclusión: se observó un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) en los grupos de edad avanzada; estos resultados pueden ser útiles para tener un punto de partida en aquellas investigaciones donde se utilicen organismos de edad avanzada.

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los modelos animales son comúnmente utilizados en bioensayos de farmacéuticas y en estudios biomédicos, para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad (Arencibia-Arrebola, 2010). Una forma simple para evaluar estos tipos de daños es utilizar la prueba de micronúcleos (MN), estos últimos son fragmentos o cromosomas completos que se pierden durante la mitosis como se ejemplifica en la figura 1, este ensayo es rápido, sencillo y económico, se realiza con tan solo una gota de sangre periférica sin la necesidad de sacrificar al organismo; dentro de este tipo de ensayo se utiliza comúnmente el modelo de ratón, del cual la cepa Balb/C es considerada la más eficiente por presentar una frecuencia de  $26.3 \pm 8.7$  EMN en individuos adultos-jóvenes (2-3 meses de edad) (Zúñiga-González, 2001), sin embargo no se tiene registrado los datos basales en ratones de mayor edad.

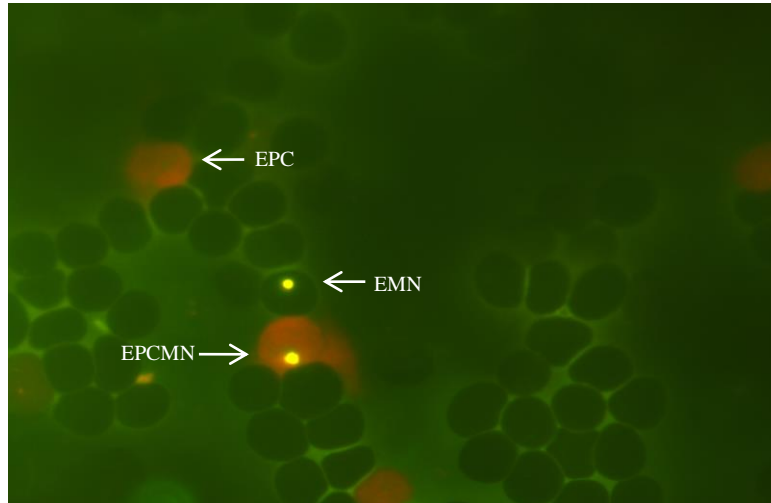


**Figura1.** Esquema de la formación de un micronúcleo

Cuando un organismo envejece existe una disminución de procesos como la fosforilación oxidativa, síntesis de proteínas y la capacidad de reparar el daño al material genético, lo que genera una acumulación de daño celular, por ende aumenta la susceptibilidad de los individuos viejos a diversas enfermedades al igual que presentan una menor capacidad de reacción ante factores ambientales (Villanueva-Egan, 2000), sin embargo esto es un proceso natural, por lo que es importante conocer los valores de daño por acumulación, dado que es un punto de partida para los trabajos donde se evalúe el efecto genotóxico relacionado al envejecimiento en modelos murinos; cuando se tienen los datos basales de daño genético por la senescencia de los individuos es más rápido realizar una evaluación en los bioensayos, tales como la prueba de micronúcleos por que ya se tiene una referencia de la cual partir al momento de revisar los resultados del ensayo; por esto se planteó como objetivo determinar la frecuencia de EMN en sangre periférica de ratones mayores a 5 meses de edad.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

La N total de animales fue de 32 sin discriminación de sexo (19 hembras y 13 machos), se formaron 5 grupos de ratones de la cepa Balb/C con edad de 4 a 9 meses, los cuales tenían una variación entre uno y dos meses aproximadamente entre grupos, a todos se les tomo una muestra de sangre periférica cada 7 días, durante tres semanas, la cual se obtuvo de la cola de los ratones, las muestras se colocaron en portaobjetos previamente lavados y rotulados, al momento del muestreo se realizaron dos frotis por cada organismo. Estos se fijaron en alcohol etílico al 96° durante diez minutos, posteriormente se tiñeron con naranja de acridina, este colorante tiñe de color amarillo brillante los micronúcleos por ser parte del ADN nuclear, de naranja el RNA y proteínas, después de la tinción se procedió a su análisis en el microscopio de fluorescencia de la marca Zeiss; Se revisó un total de 96 muestras para obtener las frecuencias totales de EMN/10000 eritrocitos totales (ET: es para evaluar genotoxicidad) (figura2). Los resultados se evaluaron mediante estadística diferencial y se les realizaron comparaciones por medio de pruebas ANOVA y Kruskal Wallis con valor de  $p < 0.05$ .



**Figura 2.** Frotis de sangre periférica de ratón, se observan dos micronúcleos: uno en un eritrocito joven (EPCMN) y otro en un eritrocito maduro (EMN)

#### 4. RESULTADOS

Los ratones de 7 y 9 meses presentaron una frecuencia de  $40.0 \pm 7.6$  y  $60.54 \pm 10.3$  respectivamente, mediante la prueba de Kruskal Wallis se obtuvieron resultados significativos de  $p = 0.021$  para 7 meses y  $p = 0.011$  para 9 meses, mientras que los ratones con 5 meses de edad presentaron una frecuencia de  $28.1 \pm 2.6$  EMN que es cercana a la registrada para adultos-jóvenes ( $26.3 \pm 8.7$ ); en el cuadro 1 se expresan los resultados, mostrando un incremento a través del tiempo como era de esperarse.

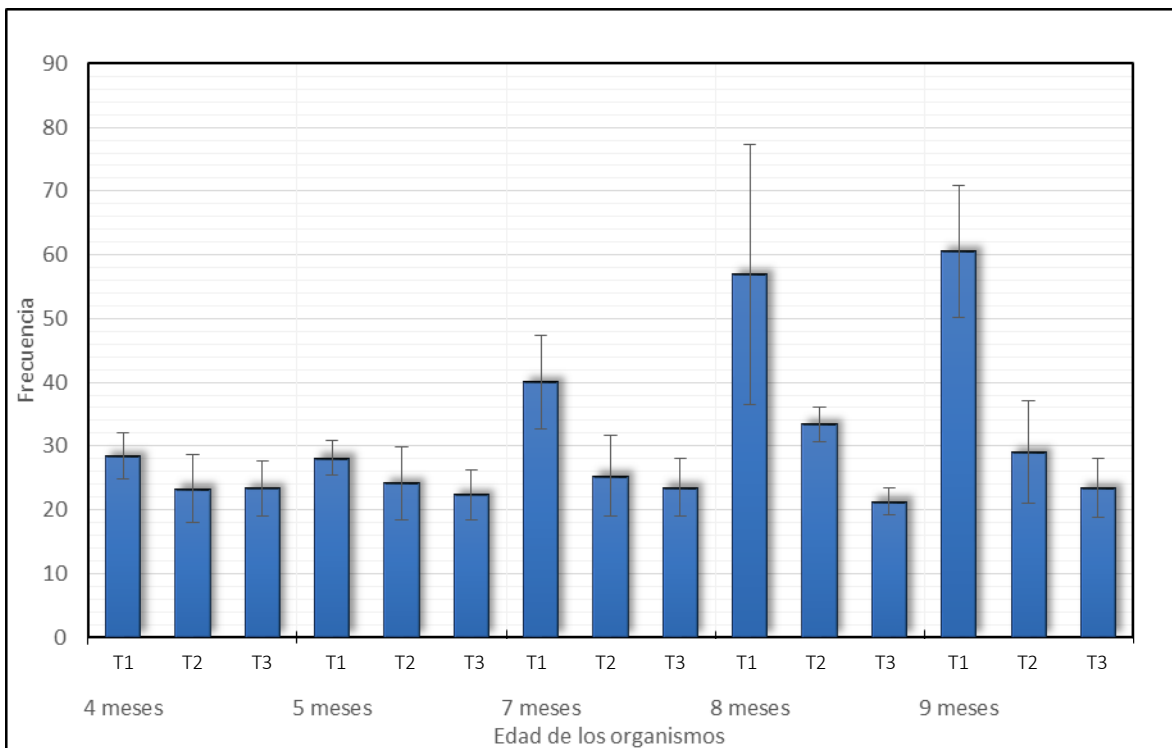
**Cuadro 1.** Frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) / 10,000 eritrocitos totales (ET); en ratones de la Cepa Balb/C

Numero de Toma	4 meses (n=4)	5 meses (n=10)	7 meses (n=8)	8 meses (n=4)	9 meses (n=6)
1	$28.4 \pm 3.6$	$28.1 \pm 2.6$	$40 \pm 7.3$	$56.9 \pm 20.3$	$60.5 \pm 10.3$
2	$23.3 \pm 5.2$	$24.1 \pm 5.7$	$25.3 \pm 6.3$	$33.4 \pm 2.7$	$29 \pm 8$
3	$23.3 \pm 4.3$	$22.3 \pm 3.8$	$23.4 \pm 4.5$	$21.2 \pm 2$	$23.4 \pm 4.7$

Valores promedio  $\pm$  desviación estándar de los valores de EMN; n = al tamaño de muestra, se aplicó la prueba Kruskal Wallis, con valor de  $p < 0.05$



**Gráfica 1.** Se observa con mayor claridad la diferencia entre los valores de EMN expresados en la tabla anterior.



## 5. CONCLUSIONES

Se observó un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) en los grupos de 7 y 9 meses, esto indica la edad donde comienza a marcarse el daño genético por acumulación; estos resultados pueden ser útiles para tener un punto de partida en aquellas investigaciones de genotoxicidad y envejecimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. G. Zúñiga-González, O. Torres-Bugarín, A. Zamora-Perez, B.C. Gómez-Meda, M.L. Ramos-Ibarra, S. Martínez-González, A. González-Rodríguez, J. Luna-Aguirre, A. Ramos-Mora, D. Ontiveros-Lira, M.P. Gallegos-Arreola. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 494 (2001), pp.161-167.
2. G. Zúñiga-González, O. Torres-Bugarín, M. L. Ramos-Ibarra A. Zamora-Perez, B. C. Gómez-Meda, A. J. Ventura-Aguilar, A. Ramos-Mora, G.G. Ortiz, C. Alvarez-Moya, A. González-Rodríguez, J. Luna-Aguirre & M. P. Gallegos-Arreola, Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environmental and molecular mutagenesis*, 37 (2001), pp.173-177.



3. D. F. Arencibia-Arrebola & L. A. Rosario-Fernández, El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Revista de toxicología en línea*, 27 (2010), pp.1-8.
4. L. A. Villanueva-Egan. Sobre el envejecimiento: una perspectiva integral. *Revista del Hospital General Dr, Manuel Gea González*, Vol.3 No 3 (2000), pp.107-114.
5. V. Pérez & F. Sierra, Biología del envejecimiento. *Revista medica de Chile*, 137 (2009), pp.296-302.
6. S. M. Sáenz, & M. R. Gómez. Biología del proceso de envejecimiento celular. *Radiobiología: Revista electrónica*, 6 (2006), 131-135.