



Artículo Original

Efecto genotóxico de ranitidina sobre el ADN de eritrocitos policromáticos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman

Genotoxic effect of ranitidine on the DNA of polychromatic erythrocytes of *Rattus norvegicus* strain Holtzman

María Elvira Quiñones-Cerna^{1,a}, Judith Stefany Rodríguez-Castañeda^{1,a}, María Leticia Amésquita-Cardenas^{1,c}, Claudio Eduardo Quiñones-Cerna^{2,b}, Mario Rodrigo Esparza-Mantilla^{3,d}

DOI

<https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2022.151.1070>

RESUMEN

Introducción: La ranitidina es un fármaco que está asociado a mutagénesis por generar alteraciones genéticas y/o carcinogénesis celular pero se desconoce su rol a nivel genotóxico en eritrocitos policromáticos. Por tanto, se investigó el efecto de ranitidina sobre el ADN en eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC) en ratas albinas (*Rattus norvegicus*, cepa Holtzman) mediante el test de micronúcleos. **Materiales y métodos:** Se estudiaron cuatro grupos de ratas: control negativo con suero salino fisiológico (0,5 ml por 15 días); control positivo con ciclofosfamida (dosis 50 mg/kg por 2 días) y dos grupos experimentales tratados con ranitidina (dosis 2 y 4 mg/kg por 15 días). Las ratas se sometieron a eutanasia y se obtuvieron preparados citológicos con tinción de giemsa 5 % por 30 min. **Resultados:** Se encontró un aumento del tamaño e incremento significativo del número de micronúcleos en los EPC de 285 ± 10 de los grupos experimentales con una dosis de 4 mg/kg; así mismo, en comparación al control negativo con 70 ± 6 . El índice de genotoxicidad fue tres veces mayor en los grupos experimentales ($12,10 \pm 0,49$; 2 mg/kg RNT y $14,26 \pm 0,51$; 2 mg/kg RNT) en relación al control negativo ($3,52 \pm 0,32$). **Conclusiones:** La ranitidina genera un estímulo creciente del índice genotóxico con elevada frecuencia de micronúcleos en EPC de *R. norvegicus* cepa Holtzman.

Palabras Clave: Ranitidina; micronúcleos; ratas; genotoxicidad; eritrocitos policromáticos (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Background: Ranitidine is a drug that is associated with mutagenesis by generating genetic alterations and / or cell carcinogenesis, but its genotoxicity in polychromatic erythrocytes is unknown. Therefore, the effect of ranitidine on DNA of micronucleated polychromatic erythrocytes (EPC) in albino rats (*Rattus norvegicus*, Holtzman strain) was researched by the micronucleus test. **Materials and methods:** Four groups of rats were studied: negative control with physiological saline solution (0.5 ml for 15 days); positive control with cyclophosphamide (dose 50 mg / kg for 2 days) and two experimental groups treated with ranitidine (doses 2 and 4 mg / kg for 15 days). The rats were euthanized and cytological preparations were obtained by 30 min staining in 5% giemsa. **Results:** An increase in the size and significant increase in the number of micronuclei in the EPC was found in the experimental groups of 285.27 ± 10.25 , compared to the negative control of 70.38 ± 6.47 . The genotoxicity index was three times higher in the experimental groups (12.10 ± 0.49 ; 2 mg / kg NRT and 14.26 ± 0.51 ; 2 mg / kg NRT) in relation to the negative control ($3.52 \pm 0,32$). **Conclusions:** Ranitidine generates an increasing stimulus of the genotoxic index with a high frequency of micronuclei in EPC of *R. norvegicus* strain Holtzman.

Keywords: Ranitidine; micronuclei; rats; genotoxicity; polychromatic erythrocytes. (Source: DeCS-BIREME).

FILIACIÓN

1. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Medicina. Trujillo, Perú.
2. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. Trujillo, Perú.
3. Universidad Privada Antenor Orrego. Facultad de Medicina Humana. Escuela Profesional de Medicina Humana. Laboratorio de Genética, Reproducción y Biología Molecular. GENERBIM. Trujillo, Perú.
 - a. Estudiante de Medicina.
 - b. Maestro en Biotecnología agroindustrial y ambiental.
 - c. Maestra en Microbiología clínica.
 - d. Doctor en Microbiología.

ORCID

1. María Elvira Quiñones Cerna / [0000-0001-5532-8351](https://orcid.org/0000-0001-5532-8351)
2. Judith Stefany Rodríguez Castañeda / [0000-0002-4869-3358](https://orcid.org/0000-0002-4869-3358)
3. María Leticia Amésquita Cárdenas / [0000-0001-5024-9312](https://orcid.org/0000-0001-5024-9312)
4. Claudio Eduardo Quiñones Cerna / [0000-0002-9703-974X](https://orcid.org/0000-0002-9703-974X)
5. Mario Rodrigo Esparza Mantilla / [0000-0003-3604-6054](https://orcid.org/0000-0003-3604-6054)

CORRESPONDENCIA

Dr. Mario Rodrigo Esparza Mantilla
Dirección: Panamá 396-B. Torres Araujo. Trujillo. La Libertad.
Teléfono: +51-913931217

EMAIL

mesparzam2@upao.edu.pe

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores, niegan conflictos de interés.

FINANCIAMIENTO

Autofinanciamento.

REVISIÓN DE PARES

Recibido: 06/09/2021
Aceptado: 15/02/2022

COMO CITAR

Quiñones-Cerna ME, Rodríguez-Castañeda JS, Amésquita-Cardenas ML, Quiñones-Cerna CE, Esparza-Mantilla MR. Efecto genotóxico de ranitidina sobre el ADN de eritrocitos policromáticos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. Rev. Cuerpo Med. HNAAA [Internet]. 6 de junio de 2022 [citado 6 de junio de 2022];15(1):42-5. DOI: <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2022.151.1070>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Versión Impresa: ISSN: 2225-5109
Versión Electrónica: ISSN: 2227-4731
Cross Ref. DOI: 10.35434/rcmhnaaa
OJS: <https://cmhnaaa.org.pe/ojs>

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es alterado por agentes físicos, químicos o biológicos, los cuales por su alta afinidad para interactuar con el material genético conducen a una variedad de efectos adversos, que incluyen apoptosis o muerte celular, división o proliferación celular alterada y mutagénesis que pueden terminar en carcinogénesis^(1,2). Los agentes químicos como los fármacos son altamente utilizados en diferentes tratamientos médicos, muchas veces no son evaluados en razón a sus reacciones adversas y toxicidad que van más allá de la relación riesgo/beneficio adecuado, y sobre todo su acción carcinogénica y genotóxica, añadiendo su uso indiscriminado; convirtiéndolos en peligro para la salud humana⁽³⁾.

Ranitidina es un fármaco altamente utilizado en la cicatrización de úlceras gástricas y duodenales, actúa como antagonista de receptores de histamina tipo 2 (H2) al inhibir la producción de ácido gástrico, aumentar el pH gastrointestinal y reducir el flujo sanguíneo hepático⁽⁴⁾. Sin embargo, la ranitidina es una molécula inestable capaz de reaccionar en condiciones de análisis estándar para formar niveles excesivos de N-nitrosodimetilamina (NDMA), así mismo, estudios previos han demostrado que las aminas de la ranitidina pueden formar NDMA por nitrosación endógena cuando se exponen a un pH del estómago⁽⁵⁾.

La NDMA se clasifica según Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) como probable carcinógeno, a su vez muchos estudios han reportado los efectos cancerígenos asociados a la NDMA^(6,7). Se ha demostrado su actividad carcinógena asociada con mayor probabilidad de presentar cánceres gastrointestinales, vejiga, tiroides y próstata, evaluadas en muchas especies de animales^(8,9). Sin embargo, es discutible si la NDMA causa cáncer directamente o simplemente aumenta la susceptibilidad al cáncer. La toxicidad genética incluye metilación del ADN, fragmentación del ADN, anomalías cromosómicas y mutación⁽⁷⁾.

Para detectar el daño del ADN por un fármaco se hace uso de diferentes bioensayos tal como el test de micronúcleos, ampliamente utilizado por su bajo costo, rápida, interpretación sencilla, alta sensibilidad (91 %) y validez. A su vez, es utilizado comúnmente para probar la genotoxicidad in vivo e identificar rupturas a nivel de los cromosomas (clastogénicos) y alteraciones a nivel del aparato mitótico (aneugénicos) en las células tratadas⁽¹⁰⁾. En la médula ósea, comprenden el 50 % de eritrocitos inmaduros del total de eritrocitos, y pueden distinguirse de forma clara y específica a partir de eritrocitos maduros porque aún contienen ARN en su citoplasma, dado que, durante la madurez, las células precursoras de eritrocitos pierden su núcleo, sin embargo, retienen el micronúcleo desarrollado durante la etapa⁽¹⁰⁾. Además, los eritrocitos inmaduros también se forman micronúcleos, sin embargo, representan solo una pequeña proporción y frecuentemente son descartados por la selección esplénica; por el contrario, los micronúcleos aumentan significativamente por inducción de agentes citotóxicos, por ejemplo, la ciclofosfamida, un agente alquilante que ha demostrado muchos efectos secundarios, incluida la toxicidad genética⁽¹¹⁾.

Existen un número limitado de estudios sobre una asociación significativa entre la exposición en el uso de ranitidina y su genotoxicidad in vivo a nivel de formación de micronúcleos^(12,13). Por ello, debido a sus efectos adversos y su toxicidad, la investigación buscó comprobar si ranitidina afecta el material genético (ADN) de los eritrocitos policromáticos (EPC) de la médula ósea de ratas albinas (*Rattus norvegicus*, cepa Holtzman) mediante el test de micronúcleos, en comparación con el efecto de la ciclofosfamida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó ratas albinas machos (*Rattus norvegicus*) de cepa Holtzman de seis semanas de edad con un peso medio de 90 g, adquiridos del Instituto Nacional de Salud. Se aclimataron por cinco días en el Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Trujillo, bajo condiciones de temperatura ambiental (23 ± 2 °C) y humedad relativa (50 ± 10 %) con periodo de luz y oscuridad, alimentados con ración y agua sin restricción⁽¹⁴⁾. Se adquirió una forma farmacéutica de ranitidina (CSPC Ouyi Pharmaceutical Co., China) con número de registro Y20190007953.

Tratamiento y vías de administración

Los ejemplares de *Rattus norvegicus* (cepa Holtzman) se distribuyeron en cuatro grupos de trabajo con cinco especímenes cada uno. Se administraron por vía intraperitoneal durante 15 días; el grupo control negativo se administró 0,5 ml de solución salina fisiológica (SSF), el grupo control positivo se administró 50 mg/kg ciclofosfamida (GP Pharm, Argentina) a partir del 12avo día; así mismo, dos grupos experimentales se administraron 2 y 4 mg/kg de ranitidina cada uno⁽¹⁵⁾. Finalizando el último día de cada uno de los grupos, se prepararon los especímenes para el test de micronúcleos.

Obtención de los preparados citológicos de médula ósea

Se preparó de acuerdo a la técnica de Kasamoto et al.⁽¹⁶⁾ adaptada de acuerdo a la investigación. Los especímenes fueron sometidos al procedimiento de eutanasia, se extrajeron quirúrgicamente los fémures, se recortó el músculo y ambos extremos del fémur para recolectar las células de la médula ósea. Se obtuvo la médula ósea en 10 ml de SSF por centrifugación a 1000 r/min por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y el pellet fue fijado en alcohol: ácido acético 3:1 (Solución de Carnoy) por 10 minutos; luego, se resuspendió y centrifugó a 1000 r/min por 10 min⁽¹⁷⁾. A partir del sedimento, se realizó el frotis en portaobjetos de vidrio y se tiñó con giemsa al 5 % durante 30 minutos.

Análisis citológico: Test de micronúcleos

Los preparados citológicos fueron analizados con un microscopio óptico binocular (Olympus, CX31-100AS, USA) con objetivo 100 X y se identificó a los eritrocitos policromáticos (EPC) normales y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en un total de 2000 EPC por espécimen según los criterios de identificación de micronúcleos por Tripodi et al.⁽¹⁸⁾. El daño del ADN se determinó mediante el índice de genotoxicidad que se basa en la relación⁽¹⁾:

$$\text{Índice de Genotoxicidad} = \frac{\text{EPCMN}}{\text{EPC total}} \times 100 \quad (1)$$

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se estimaron las medias y desviación estándar para frecuencias de EPCMN mediante el software Minitab versión 18, se realizó las comparaciones estadísticas entre tratamientos a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia de $p < 0,05^{(19)}$.

Aspectos éticos

Se aplicó las estrategias de Ética según Hubrecht & Carter(20), y se aprobó de acuerdo con el reglamento del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Trujillo (N° 013-2020-UNT-FM-C.E)⁽¹⁷⁾.

RESULTADOS

Se evaluó el efecto de ranitidina sobre el ADN de eritrocitos policromáticos de las ratas albinas (*Rattus norvegicus*, cepa Holtzman) mostrando variación del tamaño de los micronúcleos en los administrados con ranitidina y ciclofosfamida; sin embargo, no había variación en los especímenes administrados con solución salina fisiológica (Figura 1).

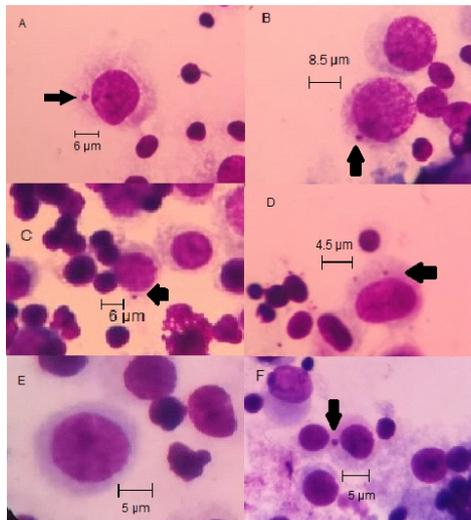


Figura 1.

Fotomicrografías de los micronúcleos (flecha) a 1000 X de EPC de médula ósea de *Rattus norvegicus* (cepa Holtzman) administrado con ranitidina 4 mg/kg (A y B), 2 mg/kg (C y D), control negativo con solución salina (E) y control positivo con ciclofosfamida (F).

En la Figura 2, se muestra una elevada frecuencia de los micronúcleos a 242 ± 10 y 285 ± 10 de los grupos administrados con ranitidina (RNT) con 2 mg/kg y 4 mg/kg, respectivamente, a su vez no existe diferencia significativa con los valores obtenidos por la ciclofosfamida; en cambio, se obtuvo una menor cantidad de 70 ± 6 en el grupo de control negativo con solución salina fisiológica.

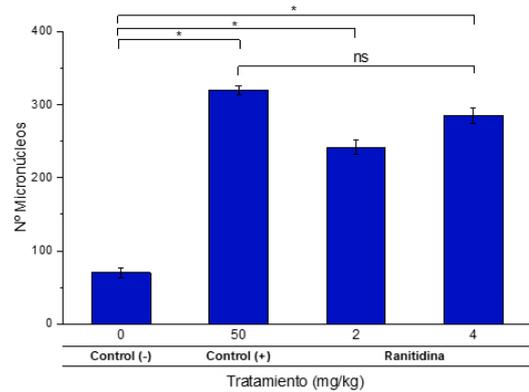


Figura 2.

Número de micronúcleos en los EPC de médula ósea de *Rattus norvegicus* (cepa Holtzman) administrados con ranitidina. El asterisco indica diferencia significativa entre los grupos indicados (*, $p < 0,05$) y ns - diferencia no significativa entre los grupos ($p > 0,05$)

En la Figura 3, se obtuvo un alto índice de genotoxicidad (IG) de $12,10 \pm 0,49$ y $14,26 \pm 0,51$ % en los tratamientos con 2 mg/kg y 4 mg/kg de ranitidina, respectivamente; en cambio, presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el control negativo ($3,52 \pm 0,32$ %). Así mismo, la dosis de ciclofosfamida (50 mg/kg) presentó un IG de $15,99 \pm 0,32$; por lo que no mostró diferencia significativa con respecto a los tratamientos con ranitidina (Figura 4).

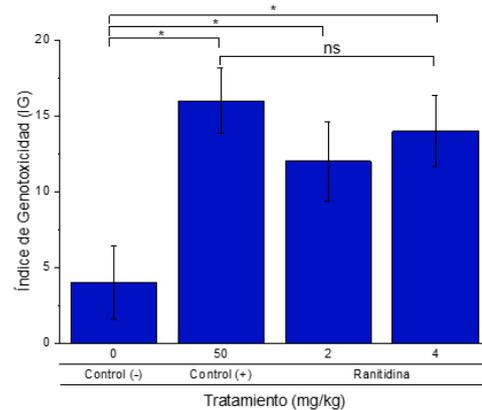


Figura 3.

Índice de genotoxicidad de los EPC de médula ósea de *Rattus norvegicus* (cepa Holtzman) administrados con Ranitidina. El asterisco indica diferencia significativa entre los grupos indicados (*, $p < 0,05$) y ns - diferencia no significativa entre los grupos ($p > 0,05$)

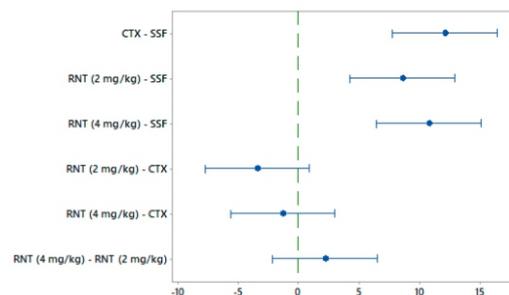


Figura 4.

Intervalos de confianza de 95 % de Tukey de las diferencias de medias para el Índice de genotoxicidad. RNT: Ranitidina, SSF: Solución salina fisiológica y CTX: Ciclofosfamida

DISCUSIÓN

El efecto clastogénico genera pequeños micronúcleos producto de roturas de fragmentos cromosómicos y aneuploidogénico, produciendo grandes micronúcleos por la falta de migración de cromosomas completos debido a los cambios en las proteínas del huso mitótico, cinetocoro, control en anafase e hipometilación de secuencias centroméricas o paracentroméricas⁽²¹⁾.

Normalmente, estos micronúcleos pueden formarse espontáneamente como un mecanismo para la eliminación de ADN extra o en el desarrollo normal de células progenitoras, sin embargo su aumento significativo es debido mayormente por agentes clastógenos o aneugenos⁽²²⁾. Así mismo, entre las dosis administradas de ranitidina (2 y 4 mg/kg) se observó un aumento del 15 % del número de micronúcleos, esto sugiere que a mayores concentraciones podría aumentar la frecuencia de micronúcleos.

El alto índice de genotoxicidad (IG) obtenidos fueron mayor a los que obtuvo Maleek et al., que reportó hasta 4,76 % de IG a 2 mg/kg de ranitidina, lo cual puede diferir de acuerdo a su fuente de fabricación y estabilidad del fármaco⁽¹⁵⁾. A su vez, otros resultados similares fueron obtenidos por Monarca et al., que encontró valores de IG hasta 12,6 % de micronúcleos en células madre del polen expuesta a nitrosaminas derivados del caucho⁽²³⁾.

El daño del ADN en los EPC de *R. norvegicus* por el efecto de los derivados que pueden formarse a partir de la ranitidina, evidencian a este fármaco como un potencial genotóxico indirectamente, a su vez que podría ser un alto riesgo para las células humanas debido a la estructura del ADN que es la misma en todas las especies y más aún de los especímenes utilizados que comparten el material genético a un 99 % de similitud con el hombre⁽²⁴⁾. Si bien es cierto, NDMA es uno de estos derivados y es clasificado como una nitrosamina cancerígena potencial, su formación es causado durante el proceso de fabricación o a medida que la ranitidina se degrada, además se ha demostrado que el aumento de la temperatura (20 a 40 °C) puede generar NDMA⁽¹²⁾.

Se describe la relación entre el número de micronúcleos y el efecto citogenético que podría ser usada como diagnóstico temprano del daño genotóxico, a su vez estos resultados obtenidos en la investigación permitirían advertir a la población acerca de sus riesgos para la salud causado por ranitidina.

La ranitidina administrada en 4 mg/kg produce genotoxicidad de 14,26 ± 0,51 % en la formación de micronúcleos de eritrocitos policromáticos en las células de la médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman e influye en la variación de la frecuencia y tamaño de los micronúcleos. Esta investigación aporta en un modelo biológico para describir efecto genotóxico de la ranitidina en células de mamíferos como aplicación biomédica para estudios preventivos para evaluar en su uso indiscriminado de fármacos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gupta PK. Genotoxicity. *Fundam Toxicol.* 2016;151-64.
- Beedanagari S. Genetic Toxicology. *Comprehensive Medicinal*

- Chemistry III. Elsevier. 2017; 195-203.
- Radhika P, Jyothi Y. A review on Genotoxicity, Its Molecular Mechanisms, Regulatory Testing in Drug Development Process. *Sereal Untuk.* 2019;10(9):4054-69.
- Wagner JA, Colombo JM. *Medicine and Media: The Ranitidine Debate.* *Clin Transl Sci.* 2020;13(4):649-51.
- White CM. Understanding and Preventing (N-Nitrosodimethylamine) NDMA Contamination of Medications. *Ann Pharmacother.* 2020;54(6):611-4.
- Adamson RH, Chabner BA. The Finding of N-Nitrosodimethylamine in common medicines. *Oncologist.* 2020;25(6):460-2.
- Yoon HJ, Kim JH, Seo GH, Park H. Risk of Cancer Following the use of N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Contaminated Ranitidine Products: A Nationwide Cohort Study in South Korea. *J Clin Med.* 2021;10(1):153.
- Tabatabaiefar MA, Moridnia A. Gastrointestinal cancers. *Cancer Genet Psychother.* 2017;589-625.
- Braunstein L, Kantor E, O'Connell K, Hudspeth A, Kucera K, Wu Q, et al. Ranitidine use, N-Nitrosodimethylamine (NDMA) production and variations in cancer diagnoses. 2021.
- Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):7-9.
- Shokrzadeh M, Habibi E, Shadboorestan A, Chabra A, Ahmadi A. The Protective Effects of Origanum vulgare L. extract on genetic damage of cyclophosphamide in Mice blood Lymphocytes using Micronucleus Test. *PBR Pharm y Biomed Res.* 2020;6(4):297-302.
- Zeng T, Mitch WA. Oral intake of ranitidine increases urinary excretion of N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis.* 2016;37(6):625-34.
- Aldawsari FS, Alshehry YM, Alghamdi TS. N-nitrosodimethylamine (Ndma) contamination of ranitidine products: A review of recent findings. *J Food Drug Anal.* 2021;29(1):39-45.
- Amésquita L, Cruz-briceño MN, Rodríguez J, Medina-rodríguez C. Efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) del daño genético inducido por ciclofosfamida en *Rattus norvegicus*. *Arnaldoa.* 2018;25(3):953-60.
- Maleek MI, Faraj SA, Alzubaidi DA. Cytogenetic Effects of Ranitidine on Stem Cell L-Asparaginase Treated Mice. *Int J Sci Eng Investig.* 2016;5(56):45-51.
- Kasamoto S, Masumori S, Hayashi M. In Vivo Micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood. In: Dhawan A, Bajpayee, editors. *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 3th edition. New York: Humana Press; 2013. 363-372.
- Esmeralda A, Amésquita L. Genotoxicidad de fenitoína en eritrocitos policromáticos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. Tesis de licenciatura. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
- Tripodi MA, Andrioli NB, Suárez OV. Genotoxicity evaluation using micronucleus test in *Rattus norvegicus* captured in urban ecosystems of Buenos Aires, Argentina. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(22):27626-34.
- Flores-Bracho MG, Takahashi CS, Castillo WO, Saraiva MCP, Küchler EC, Matsumoto MAN, et al. Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. *Clin Oral Investig.* 2019;23(7):2913-9.
- Hubrecht R, Carter E. Implementing change The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals.* 2019;9:754-63.
- Chondrou V, Trochoutsou K, Panayides A, Efthimiou M, Stephanou G, Demopoulos NA. Combined study on clastogenic, aneugenic and apoptotic properties of doxorubicin in human cells in vitro. *J Biol Res.* 2018;25(1):1-13.
- Pavanello S, Lotti M. In Biomarkers in Toxicology. In: Gupta R, editor. *Biomonitoring exposures to carcinogens.* Cambridge: Elsevier Inc.; 2014. 785-798.
- Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Moretti M, Villarini M, Spiegelhalder B, et al. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2001;490(2):159-69.
- Shimoyama M, Laulederkind SJF, De Pons J, Nigam R, Smith JR, Tutaj M, et al. Exploring human disease using the Rat Genome Database. *DMM Dis Model Mech.* 2016;9(10):1089-95.