

Alteraciones producidas por la administración de Rodamina 6GO en ratón albino

C. Soler, J. Núñez, M. Núñez y A. Núñez

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias Biológicas
Burjasot/Valencia (España)

(Recibido el 5 de marzo de 1982)

C. SOLER, J. NUÑEZ, M. NUÑEZ and A. NUÑEZ. *Changes Produced in Albino Mouse by Application of Rhodamine 6GO*. Rev. esp. Fisiol., 38, 383-392. 1982.

Effects from daily treatment with Rhodamine 6GO (s.c. injection) on albino mouse were studied.

The two doses, 5 and 7 mg/kg/day, were applied for periods of 14 or 28 days, with a 21 day break between two 14 days treatments in the latter case.

Controls were only treated with physiological saline. A decrease in corporal weight and rectal temperature, as well as a decrease in ingestion and faeces together with urine increment were observed in the experimental animals during the first period of treatment.

Normal levels were recovered during the break time, but the previous pattern reappeared during the second period of treatment. Suprarenals, liver, kidneys and spleen increased in some experimental groups when compared with controls whereas the thymus presented no significant differences. The studied organs showed signs of impairment.

La Rodamina 6GO (R6GO) es un fluorocromo capaz de emitir luz anaranjada o verde-amarillenta al ser excitado con luz verde o azul, respectivamente. En nuestro laboratorio se está comprobando su gran utilidad en los estudios de fisiología experimental, lo que se debe a su fijación *in vivo* sobre ciertas estructuras biológicas. En este sentido, NÚÑEZ (9, 10) y SOLER *et al.* (20) han puesto de manifiesto que tras su aplicación s.c. a dosis que no precisan ser muy elevadas (basta con 2,5 mg/kg) y un tiempo de espera de 15 min, la difusión se generaliza por vía sanguínea a todo el organis-

mo, si bien la aparición de fluorescencia debida a la presencia del fluorocromo se localiza con claridad en ciertos órganos, entre los que destacan: las glándulas salivales, las vías biliares (desde sus ramificaciones más finas), una zona de la cabeza del epidídimo (que los autores denominan *zona F*, [19, 21]), las glándulas endocrinas y ciertas partes del sistema nervioso que se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica. Su eliminación, que es relativamente lenta, se realiza de modo fundamental por el hígado, a través de los conductos biliares (11-13), de forma que se incorpora a las heces, si bien

una cierta cantidad se evacúa por los riñones, apareciendo en orina (14, 15).

Su uso no se ciñe a las posibilidades que ofrece como método de demostración *in vivo* de distintas estructuras orgánicas, lo que proporciona grandes posibilidades en los estudios sobre variaciones del estado funcional de las mismas (7, 11-15), sino que además ejerce una actividad farmacológica propia, que está siendo estudiada en diversos órganos (2, 3, 16-18, 23).

El presente trabajo se centra en el estudio de la mencionada actividad farmacológica en cuanto a las alteraciones producidas a nivel metabólico y morfológico.

Material y métodos

Se han utilizado ratones Charles River, criados en el propio Departamento. Se emplearon 16 machos adultos de edad comprendida entre 4 y 5 meses y cuyo peso inicial oscilaba entre 35 y 45 g y que se mantuvieron en condiciones ambientales y de alimentación estándar.

Los animales experimentales se sometieron a tratamiento diario con R6GO (Chroma-Gesellschaft, Schmit & Co.), mientras que los controles se inyectaron con suero fisiológico. Tras ensayar distintas dosis se escogieron dos, ambas subletales, como más adecuadas: 5 y 7 mg/kg/día, esta última en el límite de tolerancia. Las concentraciones utilizadas fueron de 2,5 mg/ml en agua bidestilada para la dosis de 5 mg/kg/día y de 3,5 mg/ml para la de 7 mg/kg/día. Las disoluciones se preparaban cada 7 días con el fin de evitar el posible envejecimiento del fluorocromo.

Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo I: 4 animales controles tratados con suero fisiológico a dosis equivalentes respecto de los animales tratados con R6GO, durante 49 días.

Grupo II: 3 animales tratados con 5 mg/kg/día de R6GO durante 14 días.

Grupo III: 3 animales tratados durante 14 días con R6GO a una dosis de 5 mg/kg/día, un período de descanso de 21 días y un nuevo período de aplicación de 14 días con la misma dosis anterior.

Grupo IV: igual que el grupo II, pero con dosis de 7 mg/kg/día.

Grupo V: igual que el grupo III, pero con dosis de 7 mg/kg/día.

Estudio de la curva de peso. Se pesó diariamente a los animales, utilizando una balanza de sensibilidad 0,1 g. Los datos numéricos se manejaron como variaciones porcentuales respecto al peso al iniciar el experimento.

Evolución de la temperatura rectal. Se tomó la temperatura rectal diariamente sólo durante las fases de tratamiento, mediante un termómetro digital Crison 815/12 (sensibilidad 0,1° C) y un termistor flexible YSI 402. Los datos se manejaron como variaciones porcentuales respecto a la temperatura inicial.

Análisis ponderal de la actividad metabólica. Se utilizaron jaulas especiales de metabolimetría. El tiempo de ensayo fue de 24 horas, consideradas entre las aplicaciones de dos días sucesivos. Los datos de consumo y de eliminación se relacionan entre sí, dando como resultado un «balance ponderal» con arreglo a la siguiente expresión:

$$BP = \frac{O + H - C - B + (\Delta P)}{P_i} \times 100$$

Donde: BP = «Balance ponderal»; O = Cantidad de orina eliminada; H = Peso de las heces excretadas; C = Consumo de comida; B = Consumo de agua; ΔP = Peso final — Peso inicial; P_i = Peso inicial. (Todo ello expresado en g.)

Estudio de las variaciones del peso porcentual de algunos órganos, así como de sus posibles alteraciones morfológicas. Una vez finalizado el tratamiento se sacrificó a los animales por exceso de anestesia etérea. Tras pesar al animal se realizó la disección y pesado de los órganos a estudiar, bazo, hígado, riñones (con una balanza de sensibilidad 0,01 g), glándulas adrenales y timo (con una balanza de sensibilidad 0,1 mg).

Los órganos se fijaron en formol al 10 % y se incluyeron en parafina. Los cortes se realizaron con un microtomo Minot, con un grosor de 6 μ m.

La tinción empleada fue la convencional de hematoxilina-eosina. Las observaciones se realizaron con un microscopio Nikon Fluophot, utilizándose dos tipos de iluminación: por transparencia con luz blanca y por epiiluminación con luz excitadora de fluorescencia de 500-550 nm, dentro de la zona verde del espectro.

Resultados

Curva de peso (fig. 1). Se observó un aumento de peso durante los dos primeros días en los animales tratados con la dosis de 5 mg/kg/día (Grupos II y III), mientras que en los tratados con 7 mg/kg/día (Grupos IV y V) el aumento fue

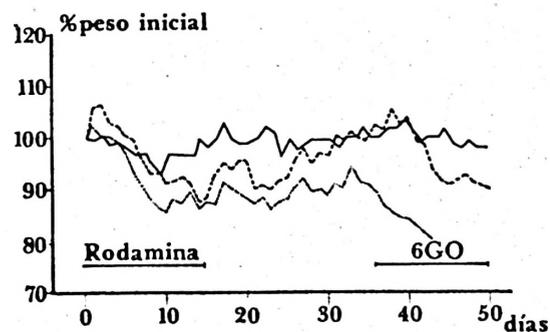


Fig. 1. Variaciones porcentuales del peso corporal respecto al peso inicial. Controles (—), tratados con Rodamina 6GO a 5 mg/kg/día (---), y a 7 mg/kg/día (···).

menor y quedó restringido al primer día. Después se observó una brusca caída en el peso de todos los animales experimentales, más acusada para la dosis de 7 mg/kg/día. Al finalizar el primer período de tratamiento, los valores para ambas dosis se encontraban próximos al 87 % de su peso inicial. En el grupo de controles los valores oscilaron en torno al valor inicial del 100 %.

Durante el período de reposo los grupos experimentales III y V fueron recuperando peso. En los animales del grupo III se estabilizó el nivel primitivo hacia los 15 días del reposo, mientras que el grupo V llegó a un valor máximo del 95 % hacia el día 20 del reposo. Los controles se mantuvieron alrededor del 100 %.

Al reiniciar el tratamiento se reprodujo la respuesta en los animales del grupo III. El grupo V mostró un descenso casi lineal y de fuerte pendiente hasta valores inferiores al 80 % en el día 10 después de recomenzar el tratamiento, muriendo todos los animales del grupo. Los controles mantuvieron su pauta anterior.

Evolución de la temperatura rectal (figura 2). Se observó un descenso gradual durante la primera fase de tratamiento para todos los grupos experimentales. La disminución fue inicialmente más acusa-

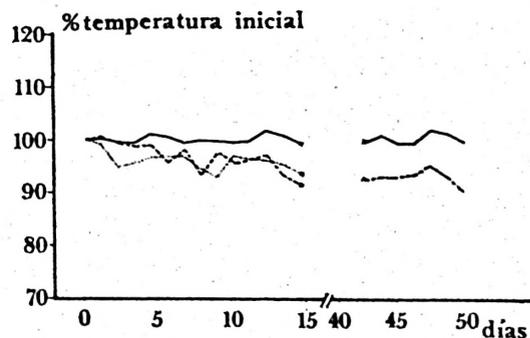


Fig. 2. Variaciones porcentuales de la temperatura rectal respecto de la inicial. Controles (—), tratados con Rodamina 6GO a 5 mg/kg/día (---), y a 7 mg/kg/día (···).

Tabla I. *Influencia de la administración de Rodamina 6GO en los niveles de consumo y eliminación, así como del «Balance Ponderal».*
 I: pruebas realizadas durante los 14 primeros días de tratamiento; R: pruebas realizadas durante el reposo; II: pruebas realizadas durante los 14 últimos días de aplicación (en el grupo III); ΔP : diferencia entre peso final y peso inicial (g); O: orina eliminada (g); H: heces excretadas (g); C: comida consumida durante la prueba (g); B: agua consumida (g); BP: balance ponderal.

Fase	mg/kg/día	ΔP	O	H	C	B	BP
I	C	0,44 \pm 2,98	0,43 \pm 0,42	1,62 \pm 0,46	5,77 \pm 1,40	5,12 \pm 0,74	-21,70 \pm 4,50
	5	-1,75 \pm 2,53	1,56 \pm 0,83 *	0,76 \pm 0,56 *	2,54 \pm 1,60 **	3,42 \pm 1,86	-11,34 \pm 5,79 **
	7	-1,40 \pm 0,87	1,57 \pm 1,25 *	0,55 \pm 0,50 **	2,14 \pm 1,79 **	1,60 \pm 1,29 *	-10,00 \pm 4,05 ***
R	C	0,70 \pm 2,94	1,38 \pm 1,16	1,61 \pm 0,44	6,35 \pm 1,14	5,07 \pm 2,25	-19,71 \pm 5,36
	5	-3,81 \pm 4,11 **	1,67 \pm 0,56	1,93 \pm 0,64	6,63 \pm 1,27	4,08 \pm 2,41	-22,53 \pm 5,26
	7	-3,41 \pm 4,30 *	1,73 \pm 0,59	1,74 \pm 0,25	6,38 \pm 1,13	4,11 \pm 1,50	-23,72 \pm 4,34
II	C	2,18 \pm 1,70	1,08 \pm 0,53	1,45 \pm 0,45	6,21 \pm 1,12	4,80 \pm 0,84	-18,40 \pm 1,95
	5	-4,03 \pm 2,10 ***	1,64 \pm 0,84 *	0,88 \pm 0,51	3,40 \pm 1,71 *	2,30 \pm 0,59 ***	-13,14 \pm 3,52 *

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (frente a los controles).

da en los grupos IV y V, aunque los valores finales fueron próximos a los de los grupos II y III. Durante la segunda fase de aplicación sólo se tomó la temperatura a los animales tratados con 5 mg/kg/día (grupo III), observándose una nueva caída. Los valores obtenidos para los controles se mantuvieron en torno al 100 % inicial durante las dos fases consideradas.

Análisis del «balance ponderal» (tabla I).

Fase I de aplicación. Los animales experimentales tuvieron consumos inferiores respecto a los controles, tanto de comida (grupos II, III, IV y V: $p < 0,01$) como de agua (grupos II y III: ns; grupos IV y V: $p < 0,05$). El peso de las heces fue también menor en los distintos grupos experimentales (grupos II y III: $p < 0,05$; grupos IV y V: $p < 0,01$). Por lo contrario, la producción de orina fue mayor en los animales tratados con R6GO, independientemente de la dosis ($p < 0,05$). En cuanto al «balance ponderal», se observó una menor actividad por parte de los animales tratados con el fluorocromo (grupos II y III: $p < 0,01$; grupos IV y V: $p < 0,001$).

Fase de reposo. Tanto los consumos de comida y agua, como los volúmenes de orina y peso de heces se estabilizaron respecto de los controles (diferencias no

significativas). Por su parte, el «balance ponderal» tampoco mostró diferencias significativas en los animales experimentales.

Fase II de aplicación. Tan sólo se realizaron pruebas con los animales tratados con la dosis de 5 mg/kg/día (grupo III) y con los controles, obteniéndose resultados paralelos a los mencionados para la fase I de aplicación (tabla I).

Se pudo comprobar la eliminación de la R6GO por vía hepática (heces de color rojo; fluorescentes), así como por vía renal (tono anaranjado en la orina, también fluorescente).

También se observó movilización de grasas en todos los animales tratados, hasta el aparente agotamiento en diversas áreas grasas, como las que rodean al epidídimo o a los riñones.

Variaciones en el peso de algunos órganos. Las glándulas adrenales mostraron un aumento de su peso porcentual respecto de los controles en los animales tratados con la dosis de 7 mg/kg/día (grupo IV: $p < 0,01$). El peso porcentual de hígado, riñones y bazo se encuentra asimismo aumentado, respecto a los controles, de forma semejante en todos los grupos de animales tratados. Este aumento resulta significativo para el hígado en el grupo II ($p < 0,01$), para los riñones en el grupo V ($p < 0,01$) y para

Tabla II. *Influencia de la administración de Rodamina 6GO sobre el peso porcentual de algunos órganos.*

Entre paréntesis el número de animales por grupo. Relación de los grupos en Material y métodos.

Organo	Grupos			
	I (4)	II (3)	III (3)	IV (3)
Adrenales	0,010 ± 0,000	0,017 ± 0,006	0,015 ± 0,007	0,023 ± 0,006 **
Hígado	4,63 ± 0,34	5,90 ± 0,17 **	5,80 ± 1,14	6,13 ± 1,29
Riñones	1,65 ± 0,10	2,10 ± 0,36	2,10 ± 0,35	2,10 ± 0,10 **
Bazo	0,23 ± 0,05	0,47 ± 0,15 *	0,43 ± 0,06 **	0,50 ± 0,10 **
Timo	0,060 ± 0,025	0,033 ± 0,015	0,025 ± 0,001 †	0,010 ± 0,000

† Un timo se destruyó durante la disección.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (frente a los controles).

el bazo en los tres grupos (grupo II: $p < 0,05$; grupos III y IV: $p < 0,01$). El timo no mostró variaciones significativas (tabla II).

Alteraciones morfológicas. Glándulas adrenales. Su aspecto morfológico se encontró diversamente alterado, con frecuente aparición de figuras de citolisis y cariólisis, así como de vacuolización focal de la zona fasciculada. También se observaron signos de hiperemia (fig. 3).

Hígado: Se observaron figuras de plasmolisis en la periferia hepática (fig. 4 a) y de cariólisis en la zona central del hígado (fig. 4 b), así como una disminución aparente de las células de von Kupffer.

Riñón: Se observó hiperemia generalizada (fig. 5 a) y presencia de hematíes en la luz tubular (fig. 5 b), así como filtración de albúminas, con presencia de material albuminoideo en las asas de Henle (fig. 5 c).

Bazo: No se encontraron alteraciones morfológicas particulares, aunque sí se observaron acúmulos de hemosiderina.

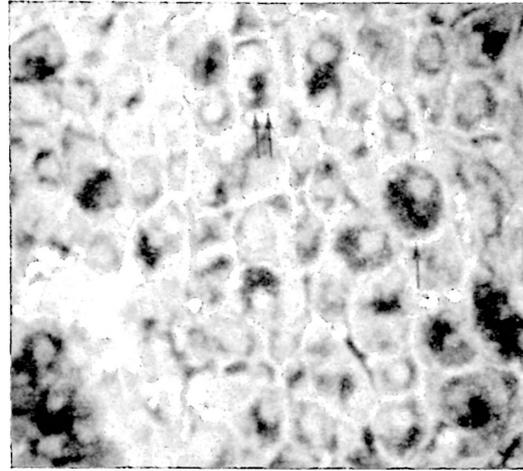


Fig. 3. Glándula adrenal de un animal tratado con 7 mg/kg/día de Rodamina 6GO durante 14 días.

Se observan figuras de cariólisis (una flecha) y de citolisis (dos flechas). Epiiluminación con luz excitadora de fluorescencia de 500-550 nm ($\times 350$).

Timo: Las alteraciones muestran un cuadro claramente involutivo.

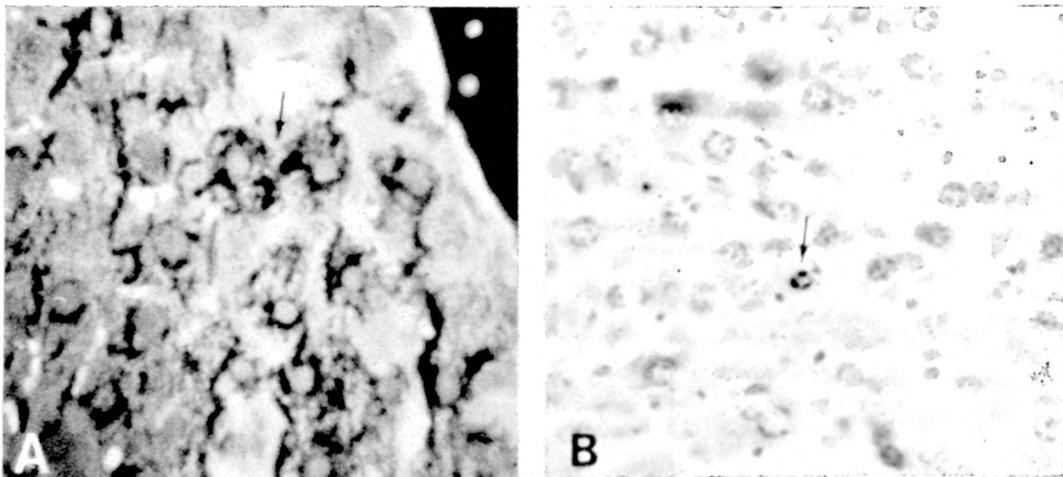


Fig. 4. Hígado de un animal tratado con 7 mg/kg/día de Rodamina 6GO durante 14 días. A) Se muestran figuras de plasmolisis. Epiiluminación con luz excitadora de fluorescencia de 500-550 nm ($\times 350$). B) Se observa una figura de cariólisis. Diailuminación con luz blanca ($\times 350$).

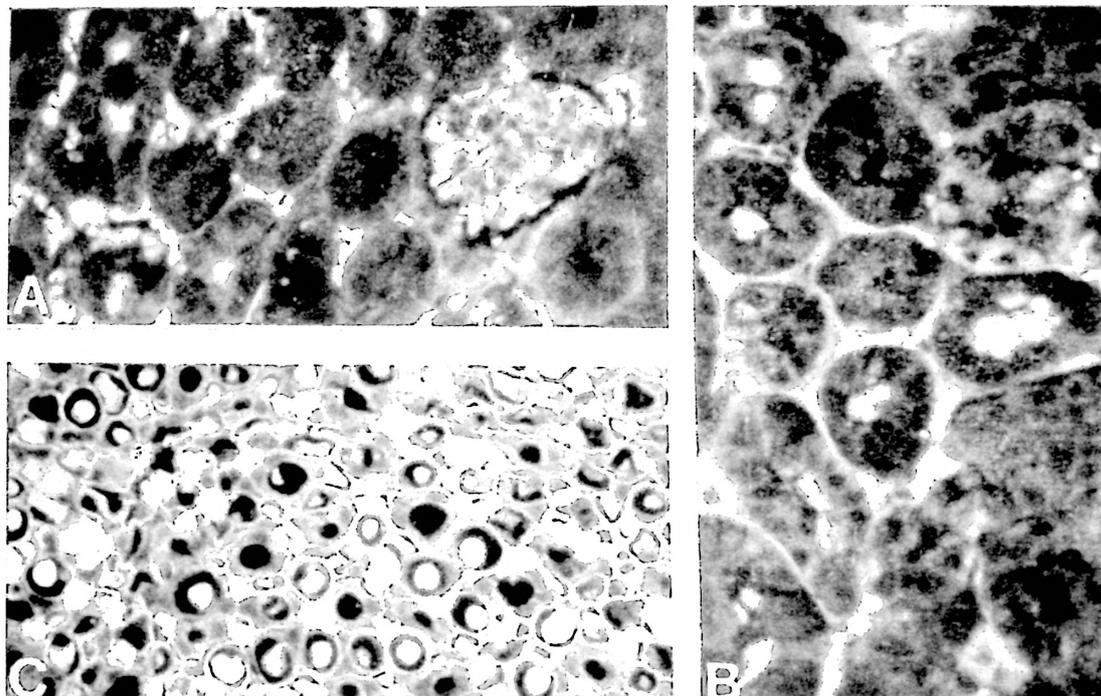


Fig. 5. Riñón de un animal tratado con 7 mg/kg/día de Rodamina 6GO durante 14 días. Epiiluminación con luz excitadora de fluorescencia, 500-550 nm (\times 350). A) Signos de hiperemia. B) Aparición de hematias en la luz tubular. C) Presencia de material albuminoideo en las asas de Henle.

Discusión

Los resultados expuestos para los animales tratados hacen pensar en una desventaja metabólica de éstos frente a los controles. No obstante, se requeriría un estudio de carácter bioquímico para confirmar este supuesto. Por otra parte, las alteraciones orgánicas observadas son indicativas de una amplia acción de la R6GO en el organismo. En los estudios realizados se han considerado diversos órganos, pertenecientes a varios sistemas, habiéndose comprobado la presencia de diversas alteraciones tanto a nivel tisular como celular. Con la excepción del acusado descenso del peso corporal en los animales tratados con la dosis de 7 mg/kg/día respecto a los tratados con 5 mg/kg/día y por el hecho de que los prime-

ros no sobrevivieron a un segundo período de aplicación, los datos de observación no resultan significativamente distintos entre los grupos de animales tratados. De cualquier forma, los datos indican una mayor alteración general con la dosis más elevada. Dentro de una misma dosis los resultados son mejantes, independientemente de los tiempos de aplicación considerados.

En otros trabajos se ha puesto de manifiesto que la R6GO presenta una acción localizada sobre ciertos órganos concretos: sistema reproductor femenino en estado normal y gravídico de ratas y ratonas albinas (2, 3, 16); sistema reproductor masculino del ratón albino (21); efecto antimitótico sobre el hígado regenerante (23); relación entre la temperatura y la actividad motora del ratón albino

(18); y alteraciones generales en animales recién nacidos (1).

De todo lo dicho se puede concluir que la R6GO promete ser de gran utilidad en los estudios de fisiología experimental, concretando su acción sobre los distintos sistemas del organismo.

Por otra parte, diversos autores hacen referencia a las actividades de otros colorantes de la familia de la Rodamina, como son la Rodamina 6G y la Rodamina B. Así, ambos fluorocromos son considerados como agentes cancerígenos, aunque algunos autores discrepen de esta opinión (4, 5). También se cita su actividad mutagénica y la de causar alteraciones de diversa índole sobre el ADN en especies vegetales y animales (6, 8).

Resumen

Se estudian algunos de los efectos producidos en el ratón albino por la administración diaria de Rodamina 6GO (inyección s.c.): 5 mg/kg/día y 7 mg/kg/día. El tiempo de aplicación para cada dosis fue de 14 ó 28 días, mediando, en este segundo caso, 21 días de reposo entre dos fases de tratamiento de 14 días. Los animales control se trataron de igual manera con suero salino fisiológico. Se encuentra descenso en el peso corporal y en la temperatura de los animales experimentales respecto a los controles. En la primera fase de aplicación se observa una disminución de la ingesta y de la eliminación de heces, junto con un aumento de la orina en los animales experimentales, recuperándose los niveles normales durante el reposo, en los grupos en que lo hubo, para volver a seguir el mismo patrón durante la segunda fase de aplicación. Las glándulas adrenales, el hígado, los riñones y el bazo muestran un aumento en algunos grupos tratados, mientras que el timo no presenta diferencias significativas. Los órganos considerados muestran signos de alteración.

Bibliografía

1. ABAD, P., ROSELLÓ, H., PUIG, J. V., GAVARA, A. y NÚÑEZ, A.: *II Congreso de la F.E.S.B.E. Madrid*, 1981. A-400.
2. GAVARA, A., GARCERÁ, M. D. y NÚÑEZ, A.: *XVIII Congreso de la S.E.C.F. Valencia*, 1979. A-012.
3. GAVARA, A., PUIG, J. V., CRUZ, M. S. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 928-932, 1980.
4. INT. AGENCY RES. CANCER: *IARC Monogr.*, 16, 221-231, 1978.
5. INT. AGENCY RES. CANCER: *IARC Monogr.*, 16, 233-239, 1978.
6. LANDA, Z., KLOUDA, P. y PLESKOTOVA, D.: En «Induction of Mutations and the Mutation Process» (J. Veleminsky y T. Gichner, eds.). Publishing House of the Czechoslovak Academic of Science, Praga, 1965, pp. 115-122.
7. MARTÍNEZ, T.: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Valencia, 1979.
8. NESTMANN, E. R., DOUGLAS, G. R., MATULA, T. I., GRANT, C. E. y KOWBEL, D. J.: *Cancer Res.*, 39, 4412-4417, 1979.
9. NÚÑEZ, A.: *XII Reunión de la S.E.C.F. Santiago de Compostela*, 1970. A-35.
10. NÚÑEZ, A.: *I Congreso de la S.E.C.F. Zaragoza*, 1975. A-16. 10.
11. NÚÑEZ, J.: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Valencia, 1981.
12. NÚÑEZ, J., TORREGROSA, G., NÚÑEZ, M. y NÚÑEZ, A.: *XVIII Congreso de la S.E.C.F. Valencia*, 1979. A-008.
13. NÚÑEZ, J., TORREGROSA, G., NÚÑEZ, M., SOLER, C. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 850-855, 1980.
14. NÚÑEZ, M.: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Valencia, 1981.
15. NÚÑEZ, M., TORREGROSA, G., SOLER, C. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 862-867, 1980.
16. PUIG, J. V., CRUZ, M. S., GAVARA, A. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 922-927, 1980.
17. PUIG, J. V., GAVARA, A., ABAD, P., ROSELLÓ, H. y NÚÑEZ, A.: *II Congreso de la F.E.S.B.E. Madrid*, 1981. A-320.
18. ROSELLÓ, H., ABAD, P., GAVARA, A., PUIG, J. V. y NÚÑEZ, A.: *II Congreso de la F.E.S.B.E. Madrid*, 1981. A-395.
19. SOLER, C.: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Valencia, 1981.

20. SOLER, C., NÚÑEZ, M., NÚÑEZ, J., TORREGROSA, G. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 886-891, 1980.
21. SOLER, C., TORREGROSA, G., NÚÑEZ, J., NÚÑEZ, M. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 892-897, 1980.
22. TORREGROSA, G., NÚÑEZ, J., NÚÑEZ, M., SOLER, C. y NÚÑEZ, A.: *Pharmacia Mediterranea*, 13, 856-861, 1980.
23. TORREGROSA, G., NÚÑEZ, J., NÚÑEZ, M., SOLER, C. y NÚÑEZ, A.: *II Congreso de la F.E.S.B.E. Madrid*, 1981. A-396.

