

Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de linfocitos de sangre periférica

Arencibia Arrebola DF*¹, Vidal Novoa A², Rosario Fernández LA³, Suárez Fernández YE⁴ y Delgado Roche L⁵

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, La Habana, Cuba.

²Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. ³ Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba. ⁴Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba. ⁵Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (IFAL, U.H), Avenida 23 No. 21425 e/ 214 y 222, La Coronela, Municipio La Lisa, la Habana, Cuba.

Resumen: En este artículo se evaluó el efecto mutágeno de la ciclofosfamida y bleomicina, con el objetivo de armonizar el número de exposiciones al ser utilizadas como controles positivos en ensayos in vivo de genotoxicidad, mediante el ensayo cometa alcalino. Se realizó en linfocitos de sangre periférica, utilizando 10 ratones/grupo/sexo de la línea Balb/c como biomodelo experimental. Fueron formados 5 grupos experimentales/sexo, el primero administrado con NaCl al 0,9% por vía intraperitoneal (i.p) como control negativo. El segundo y el tercero administrados con ciclofosfamida por vía i.p, con diseños de tratamientos diferentes en dosis de 50 mg/kg. El cuarto y quinto grupo fueron administrados con bleomicina por vía i.p, igualmente en dos diseños de tratamientos diferentes en dosis de 20 mg/kg. El mayor valor de inducción de daño se obtuvo con el uso de la ciclofosfamida y bleomicina, ambas en el diseño de administración de 48 y 24 horas antes de la eutanasia. Este estudio será aplicable a la evaluación de drogas que no han sido exploradas en el ámbito de la antigenotoxicidad y genotoxicidad in vivo. Además permitirá contar con un mayor conocimiento acerca de este ensayo, favoreciendo su validación.

Palabras clave: Ensayo cometa alcalino, linfocitos de sangre periférica, ratones Balb/c, ciclofosfamida, bleomicina.

Abstract: Balb/c mice response against cyclophosphamide and bleomycin in the alkaline comet assay of peripheral blood lymphocytes. In this article were evaluated the mutagenic effect of cyclophosphamide and bleomycin, with the objective of harmonizing the number of exhibitions when being used as positive controls on in vivo genotoxicity assay, by means of alkaline comet assay. It was carried out in peripheral blood lymphocytes, using 10 mice/group/sex of the Balb/c line as experimental biomodel. We were formed 5 experimental groups per sex. The first group was administered with NaCl 0,9% by intraperitoneal (i.p) route. The second and third groups were administered with cyclophosphamide by i.p route, with designs of different treatments at doses of 50 mg/kg. The fourth and fifth groups were administered with bleomycin by i.p route, equally in two designs of different treatments at doses of 20 mg/kg. The bigger inductions of damage were obtained with the use of the cyclophosphamide and bleomycin, both in the design of 48 and 24 hours administration before the euthanasia. This study will be applicable to the drugs evaluation that they have not been explored in to the in vivo antigenotoxicity and genotoxicity environment. It will also allow having a bigger knowledge about this assay, favoring their validation.

Key words: Alkaline comet assay, peripheral blood lymphocytes, Balb/c mice, cyclophosphamide, bleomycin.

Introducción

En 1988, Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual [1,2].

Este ensayo se encuentra en fase de validación, aunque en el período 2000-2005 se observó un incremento considerable en cuanto a la mayor profundización de su repetibilidad y consistencia analítica [3-8]. Por lo que todo estudio que se lleve a cabo para tener un mayor conocimiento acerca de este ensayo constituye un resultado totalmente novedoso a la par que permitirá la validación y aceptación de esta técnica por las autoridades regulatorias internacionales de mayor importancia tales como la OECD, ICH, FDA y EMEA.

Por otra parte es conocido que en los estudios de genotoxicidad in vivo se utilizan sustancias mutágenas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL) [9-12]. La primera constituye un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos [13]. La segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN; al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres [14,15].

Ambas drogas son utilizadas con gran efectividad como antineoplásicas. La CF pertenece al grupo cloro-etilaminas, con el desarrollo de éste agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral. Considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular [16]. En tanto la BL es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales [14,15].

Surgiendo como problemática la existencia de diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutágenas como controles positivos en los ensayos de mutagénesis. No existiendo una armonización o consenso establecido en estos ensayos, que tenga en cuenta la frecuencia, dosis, vía y tiempo de la eutanasia en el biomodelo a utilizar. Diversas dosis han sido utilizadas, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal respondedor a la acción de la sustancia mutágena utilizada.

Dada estas consideraciones decidimos en este artículo evaluar en

*e-mail: darencibia@finlay.edu.cu

ratones Balb/c de ambos sexos, la respuesta a CF y a BL, administradas por vía intraperitoneal (i.p), diferenciado la respuesta a ambos mutágenos cuando son administrados 48 y 24 horas antes de la eutanasia y cuando es administrado 24 horas antes del mismo, en el ensayo cometa alcalino de linfocitos de sangre periférica.

Se utilizó como biomodelo el ratón de la línea Balb/c, ya que demostró bajos índices de genotoxicidad espontáneos en varios estudios, siendo bajo nuestras condiciones experimentales el biomodelo ideal [17].

Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, la humedad entre $60 \pm 10\%$ y los ciclos de luz- oscuridad fueron de 12 horas. El alimento administrado 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. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio [18].

Diseño experimental

En todos los grupos experimentales, las sustancias evaluadas se administraban en el horario de 10:30-11:30 a.m. y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratones/grupo/sexo.

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza y número de lote L451491932. Administrado por vía i.p, en dosis de 10 mL/kg en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones [19].

En los grupos experimentales 2 y 3 se utilizó la CF {N,N-bis (cloruro de etilo)-N', O-esterdiamida del ácido fosfórico propinil-(C17H15Cl2N2O5P) }, adquirida de la firma comercial mexicana Lemery S.A bajo la marca LEDOXINA. Con un 98% de pureza y lote de fabricación número 27555/2009. La CF fue administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes de la eutanasia programada para el grupo 2 y 24 horas antes de la eutanasia programada para el grupo 3. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg [19], por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9% administrado a razón de 10 mL/kg [20].

En los grupos experimentales 4 y 5 se utilizó la BL, adquirida de los Laboratorios PISA, S.A. de C.V. México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo). Este producto contenía un 98% de pureza, con lote de fabricación número 102258/RM2009/IPPA. La BL fue administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes de la eutanasia programada para el grupo 4 y 24 horas antes de la eutanasia programada para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 20 mg/kg [21,22], por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9% administrado a razón de 10 mL/kg.

La vía de administración utilizada en las sustancias evaluadas constituye una de sus vías terapéuticas. No obstante al utilizarse como controles positivos en ensayos preclínicos de genotoxicidad y de antigenotoxicidad solo se ha descrito la i.p como vía más relevante siendo la propuesta por este ensayo [22,23,26]. Al realizar una búsqueda actualizada teniendo en cuenta el uso de ambas sustancias como controles positivos en los ensayos de mutagénesis in vivo se evidenció la administración por vía i.p con 1 y 2 dosis con intervalos de 24 horas entre exposiciones. Pretendiendo en este trabajo realizar una armonización en cuanto al número de exposiciones, siempre y cuando se manifestarán diferencias significativas claras entre los tratados y el control negativo en ambos sexos.

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 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.

Control del peso corporal

Fue controlado al inicio y antes de realizar la eutanasia para cada grupo experimental teniendo en cuenta el sexo.

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales es linfocitos de sangre periférica

Se realizó la punción en la cola de todos los animales y se extrajo una gota de sangre la cual era equivalente aproximadamente a 20-25 μL [23-25], para verterla en un vial que contenía previamente 10 μL de heparina sódica, manipulando las muestras a 4°C . Todo el muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN, para de esta forma disminuir los falsos positivos y que la manipulación no constituyera un factor determinante de los resultados.

Las muestras (15-20 μL) fueron suspendidas en 140 μL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Posteriormente se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa. Se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1% Tritón, 10% DMSO, pH 10) por 1,5 h a 4°C y sometidas a 20 min de desenrollamiento en solución reguladora de electroforesis (3% NaOH 10 N, 0,5% EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se realizó a 300 mA y 1 V/cm durante 18 a 20 min. Las láminas fueron lavadas con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0,4 M a pH 7,5 y aclaradas con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0,05% [2,3,25].

Los nucleoides fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz, por tres observadores independientes, para establecer posteriormente un promedio entre lecturas [2, 3, 25].

Se analizaron 200 linfocitos/animal y 100 linfocitos/gel, cuantificándose 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa fue clasificado acorde a la categoría o grado de daño correspondiente en el ADN entre 0 y 4 [2,26]. La magnitud del daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con Collins [2], con valores posibles en un rango de 0-400 [27]. Además se evaluó la longitud de migración del ADN que es proporcional a las rupturas de sus cadenas.

Análisis estadístico

Los resultados en todas las variables analizadas se presentan como $X = \text{media} \pm \text{DE} = \text{desviación estándar}$, para las dos réplicas

experimentales. El peso corporal fue analizado con la prueba de ANOVA verificando tales supuestos que incluyó normalidad, dependencia entre observaciones y homogeneidad de varianzas. Las comparaciones entre todos los grupos para analizar parámetros del ensayo Cometa (UA, diferentes niveles de daño y longitud de migración del ADN) se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney [25]. Además con este mismo programa y prueba se realizaron las comparaciones de los resultados entre mutágenos. Se estableció a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6 [6,25].

Tabla 1. *Peso corporal en ratones Balb/c de ambos sexos en el estudio de la inducción de daño al ADN de linfocitos de sangre periférica con Ciclofosfamida y Bleomicina.*

| Grupos (mg/kg) | Sexo | Peso Inicial ^T | Peso Final ^T |
|------------------|------|---------------------------|-------------------------|
| Control Negativo | H | 25.2 ± 3.2 | 25.3 ± 3.4 |
| | M | 26.5 ± 2.8 | 26.7 ± 3.2 |
| CF1 ¹ | H | 25.3 ± 4.0 | 25.6 ± 4.2 |
| | M | 26.8 ± 1.7 | 26.8 ± 2.7 |
| CF2 ¹ | H | 25.5 ± 2.6 | 25.9 ± 2.3 |
| | M | 26.2 ± 3.3 | 26.5 ± 3.7 |
| BL1 ¹ | H | 25.7 ± 2.0 | 25.9 ± 2.6 |
| | M | 26.6 ± 2.9 | 26.8 ± 3.2 |
| BL2 ¹ | H | 25.1 ± 4.6 | 25.5 ± 4.0 |
| | M | 26.9 ± 2.4 | 27.1 ± 2.1 |

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, con $p<0.05$ prefijada.

(X media; DE desviación estándar, para las dos réplicas experimentales).¹Administración por vía i.p.

CF1= Ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia,

CF2= Ciclofosfamida administrada

48 y 24 horas antes de la eutanasia, BL1= Bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia

y BL2= Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia.

Resultados

Durante la inspección clínica diaria a los animales no se encontraron síntomas clínicos indicativos de toxicidad. El análisis del peso corporal, indicador de salud animal no arrojó diferencias significativas entre controles negativos y tratados con las dos sustancias mutagénicas en sus diferentes diseños de administración una vez finalizado el estudio (Tabla 1).

Los cuatro grupos en los que fueron utilizadas las sustancias mutagénicas difirieron significativamente con el grupo control solvente en las variables analizadas (Tabla 2). En el grupo control solvente se obtuvieron longitudes de migración del ADN con valores entre 62.40-63.56 μm . Las UA experimentaron valores entre 49.55-58.74 en ambos sexos. Además se encontraron altos porcentos de nucleoides con grado de daño 0, con valores entre 48,13-58,27%.

Al estudiar la variación de respuesta entre grupos experimentales se encontró diferencias significativas en ambos sexos al comparar los dos esquemas de tratamientos en los cuales se utilizó la CF. Obteniéndose mayores resultados de inducción de daño en el ADN y de UA con el uso de la CF administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia. Los valores de UA en este grupo estuvieron entre 122,03±9,27 en las hembras y de 115,50±11,29 en los machos. El % de nucleoides grado 0 estuvo en las hembras entre 21,26±7,01% y en los machos entre 25,25±4,12%. En este grupo experimental se observó un aumento considerable de nucleoides en los diferentes grados de daño. El % de nucleoides grado 1 se encontró en el rango entre 51,94-54,79 % en ambos sexos. Para el caso de los nucleoides grado 2 los valores fueron 9,71-10,01 teniendo en cuenta los dos sexos. El % de nucleoides grado 3 estuvo entre 8,06-9,14 % y el % de grado 4 entre 4,84-5,10 en ambos sexos. Al utilizar la CF en dos ocasiones se logro aumentar la longitud de migración del ADN, observándose valores entre 82,,86-84,71 μm .

Los dos grupos tratados con BL también difirieron de forma significativa, al tener en cuenta la respuesta de los linfocitos de esta especie de ratón a diferentes números de exposiciones del mutágeno evaluado. Obteniéndose mayores resultados de inducción al administrar la BL en dos ocasiones. Los valores de UA para el grupo

Tabla 2. *Ensayo Cometa alcalino en ratones Balb/c de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de linfocitos de sangre periférica con Ciclofosfamida y Bleomicina.*

| Grupos (mg/kg) | Sexo | Longitud de Migración del ADN (μm) | Unidades Arbitrarias ^T | Nivel 0 ^T | Nivel 1 ^T | Nivel 2 ^T | Nivel 3 ^T | Nivel 4 ^T |
|------------------|------|---|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | | | (% Nucleoides) | | | | |
| Control Negativo | H | 62.40 ± 3.18 | 49.55 ± 12.88 | 58.27 ± 2.24 | 35.12 ± 7.13 | 5.40 ± 5.10 | 1.21 ± 0.55 | 0.00 ± 0.00 |
| | M | 63.56 ± 4.21 | 58.74 ± 5.41 | 48.13 ± 12.11 | 46.22 ± 1.80 | 4.49 ± 4.82 | 1.10 ± 0.21 | 0.06 ± 0.01 |
| CF1 ¹ | H | 71.10 ± 6.77a | 75.89 ± 5.88a | 46.21 ± 4.58a | 40.11 ± 10.26a | 7.36 ± 4.28a | 4.22 ± 1.62a | 2.10 ± 1.15a |
| | M | 73.21 ± 4.62a | 80.99 ± 8.46a | 39.23 ± 3.11a | 48.37 ± 9.32a | 6.44 ± 2.31a | 4.10 ± 2.09a | 1.86 ± 0.77a |
| CF2 ¹ | H | 82.86 ± 9.10abc | 122.03 ± 9.27abc | 21.26 ± 7.01abc | 54.79 ± 8.84abc | 9.71 ± 5.81abc | 9.14 ± 2.40abc | 5.10 ± 2.33abc |
| | M | 84.71 ± 10.02abc | 115.50 ± 11.29abc | 25.25 ± 4.12abc | 51.94 ± 13.10abc | 10.01 ± 0.99abc | 8.06 ± 1.27abc | 4.84 ± 1.76abc |
| BL1 ¹ | H | 72.61 ± 5.33a | 75.11 ± 6.95a | 46.49 ± 2.94a | 39.81 ± 11.04a | 7.79 ± 3.69a | 3.92 ± 2.72a | 1.99 ± 1.28a |
| | M | 73.58 ± 5.02a | 83.02 ± 7.36a | 38.31 ± 4.41a | 49.04 ± 10.17a | 6.01 ± 3.08a | 4.60 ± 1.78a | 2.04 ± 0.53a |
| BL2 ¹ | H | 83.31 ± 7.50abc | 125.65 ± 5.59abc | 19.38 ± 8.96abc | 56.10 ± 6.99abc | 9.80 ± 4.67abc | 8.93 ± 3.28abc | 5.79 ± 3.26abc |
| | M | 84.11 ± 9.43abc | 118.69 ± 8.26abc | 24.71 ± 3.83abc | 50.56 ± 14.10ac | 11.16 ± 1.05abc | 8.47 ± 2.05abc | 5.10 ± 1.09abc |

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando el test de U de Mann Whitney, con $p<0.05$ prefijada.

(X media; DE desviación estándar, para las dos réplicas experimentales).¹Administración por vía i.p.

a= difiere con el control negativo, b=difiere entre los diferentes tratamientos para el mismo mutágeno en el mismo sexo y

c=resultados similares, que no difiere al realizar una comparación entre mutágenos sin tener en cuenta el tratamiento en el mismo sexo.

CF1= Ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia, CF2= Ciclofosfamida administrada

48 y 24 horas antes de la eutanasia, BL1= Bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia

y BL2= Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia.

en el cual se administró la BL 48 y 24 horas antes de la eutanasia estuvieron entre $125,65 \pm 5,59$ en las hembras y $118,69 \pm 8,26$ en los machos. El % de nucleoides grado 0 fue de $19,38 \pm 8,96\%$ en las hembras y $24,71 \pm 3,83\%$ en los machos. En este grupo experimental igualmente se observó un aumento considerable de nucleoides en los diferentes grados de daño. Para el caso del % de nucleoides grado 1 los valores estuvieron entre 50,56-56,10 considerando ambos sexos. El % de nucleoides grado 2 estuvo entre 9,80-11,16 y los valores del % de nucleoides grado 3 estuvieron en el rango entre 8,47-8,93, para ambos sexos. En cambio los valores del grado de daño 4 estuvieron entre 5,10-5,7%, teniendo en cuenta igualmente ambos sexos. En este grupo experimental se observó un aumento de la longitud de migración del ADN, que difiere con los demás grupos evaluados excepto en el grupo en el que se utilizó la CF en dos ocasiones. Los valores de longitud de migración del ADN estuvieron entre $83,31-84,11 \mu\text{m}$, al considerar ambos sexos.

No se observaron diferencias significativas entre la CF y BL en los grupos en los cuales se administraron los animales en dosis única. Como tampoco difirieron los resultados entre CF y BL al

administrarlas en dos ocasiones 48 y 24 horas antes de la eutanasia en ambos sexos.

En la figura 5 se puede observar el cometa grado 4 que indujo la CF al ser administrada 24 horas antes de la eutanasia. En la figura 10 se observa el cometa grado 4 que indujo este mismo mutágeno pero al ser administrado en dos ocasiones, 48 y 24 horas antes de la eutanasia. La figura 15, muestra el cometa grado 4 que induce la BL al ser administrada 24 horas antes de la eutanasia. La figura 20, muestra el cometa que induce este mismo mutágeno al ser administrado 48 y 24 horas antes de la eutanasia. Así mismo en la figura 21 se observa un cometa grado 0 de una hembra del grupo control negativo (NaCl al 0,9%) y la figura 22 pertenece a un cometa grado 0 de un macho igualmente del grupo control negativo (NaCl al 0,9%).

Discusión

Se demostró que las sustancias evaluadas no lograron ser tóxicas a nivel sistémico pero sí a nivel de ADN, ya que no se encontraron animales que experimentaran síntomas clínicos indicativos de

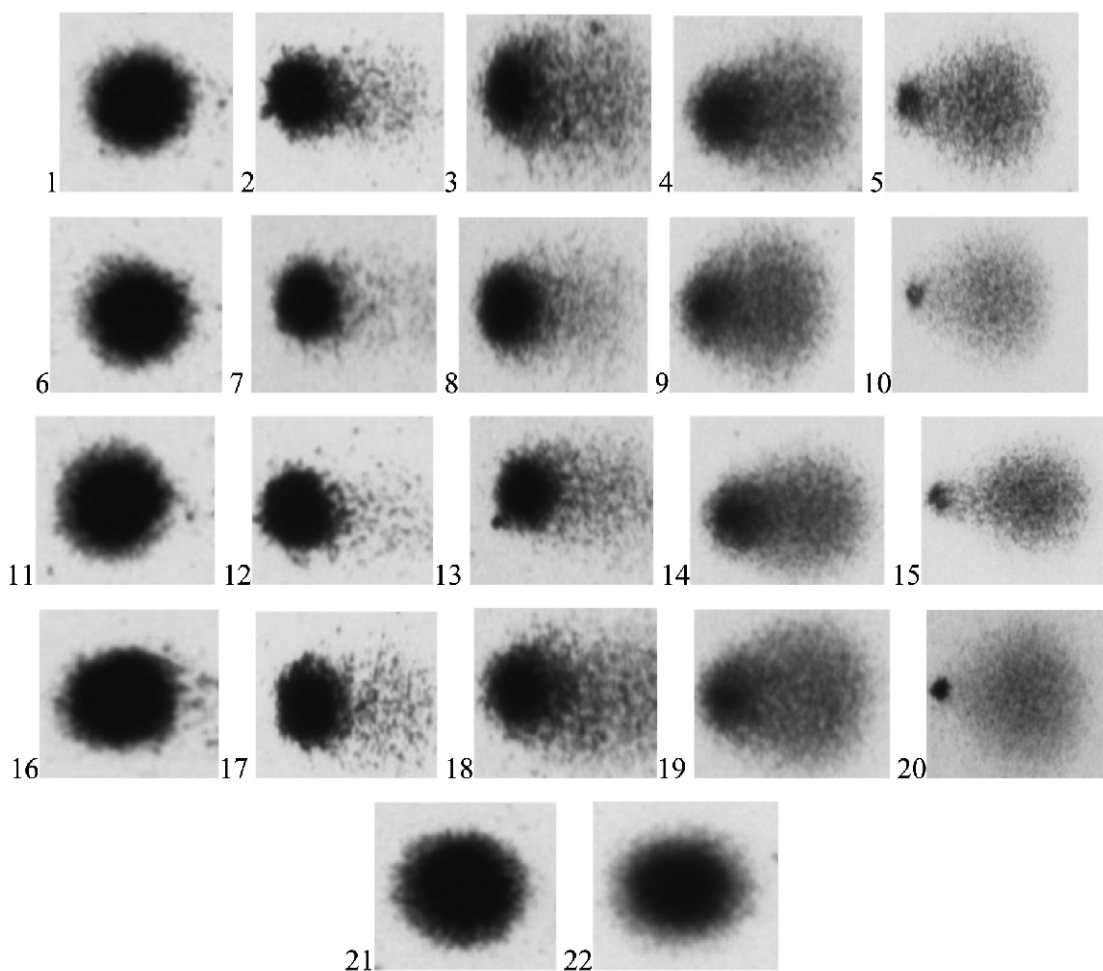


Figura 1-5. Ciclofosfamida administrada 24 horas antes de la eutanasia (Nivel de daño 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha).

Figura 6-10. Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia (Nivel de daño 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha).

Figura 11-15. Bleomicina administrada 24 horas antes de la eutanasia (Nivel de daño 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha).

Figura 16-20. Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes de la eutanasia (Nivel de daño 0, 1, 2, 3, 4 de izquierda a derecha).

Figura 21. Control negativo (Nivel de daño 0, ratón hembra).

Figura 22. Control negativo (Nivel de daño 0, ratón macho).

toxicidad (Tabla 2).

Los animales en todos los grupos tratados experimentaron un aumento normal del peso corporal al tener en cuenta el inicio y final del estudio. Estos resultados de peso concuerdan con los datos históricos de esta especie y línea [23,28].

Al diferir los resultados de los cuatro grupos tratados con los mutágenos contra el control negativo se demostró la inducción de respuesta genotóxica aceptable en linfocitos de sangre periférica, siendo perceptible por este ensayo.

Los valores de daño espontáneos en el grupo tratado con NaCl al 0,9%, concuerdan con los hallados por nuestro colectivo de autores al ser evaluados estos mismos parámetros en ratones Balb/c de ambos sexos [28]. Lo antes expuesto se cumple para el % de nucleoides en cada uno de los niveles analizadas como para las UA y la longitud de migración del ADN [28].

Los dos esquemas de tratamientos en los cuales se utilizó la CF difirieron de forma significativa en ambos sexos. Estos resultados son lógicos si tenemos en cuenta que la CF es un promutágeno y como tal, necesita la intervención del metabolismo para ejercer su acción. Como consecuencia, es de esperar que se necesite más dosis o más tiempo para producir el efecto mutágeno [29,30]. Además en este grupo experimental fueron observados los valores más altos de longitud de migración del ADN, parámetro que es proporcional a las rupturas de sus cadenas. Estos valores se encuentran por encima y difieren significativamente con los obtenidos en la evaluación genotóxica del D-003 utilizando el ensayo cometa alcalino in vivo en linfocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley [31].

Los valores significativos encontrados en los dos tratamientos en que se utilizó la BL, se deben a una mayor biodisponibilidad del mutágeno, estando estrechamente relacionadas las variables número de exposiciones-daño detectado [22]. Como consecuencia de ser este citostático un mutágeno verdadero [22,32].

Se reporta en la literatura con mayor uso como control positivo en el ensayo cometa la BL [14,22,23], midiendo el daño tanto en modelos de genotoxicidad como de estrés oxidativo. La BL induce labilidad de la estructura del ADN y ruptura del ADN al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres [16,32]. La BL se une al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo activado genera radicales libres que se encargan de la ruptura, lo cual trae consigo la aparición de aberraciones sobre todo rupturas de cromátidas, huecos, fragmentos y translocaciones, éstas últimas en menor medida [22].

En este estudio no difirieron los resultados de inducción de daño al ADN entre el grupo tratado con CF en dos ocasiones contra el grupo tratado con BL en dos ocasiones respectivamente. Afirmando que es posible utilizar este mutágeno en la inducción de daño en la estructura primaria del ADN. Se ha destacado dentro de sus efectos principales la formación de monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparadores. Estos manifiestan una determinada migración del ADN degradado al ser observado en el ensayo a nivel de células individuales, demostrado en las figuras 5 y 10 [27,29].

Por otra parte la CF es un mutágeno más barato, fácil de manipular, siendo de menor riesgo para el personal. Permite un rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles contaminados durante el experimento [16,33]. Pudiéndose implementar con mayor grado de utilidad como control positivo en este ensayo, para evaluar el efecto genotóxico y antigenotóxico de nuevas drogas. Además es posible su inclusión en estudios de daño por estrés oxidativo al ADN [34].

Se puede observar en las figuras 10 y 20 lo pequeña que resulta la cabeza del cometa y la larga longitud de los fragmentos degradados. Se destaca un incremento considerable de la migración y una mayor cantidad de fragmentos de ADN degradados, producto de los procesos de necrosis o apoptosis inducidos por ambos mutágenos [35]. En las figuras 5 y 15 se aprecia una cola menor en comparación con las figuras 10 y 20. Además la cola y el núcleo experimentan menor degradación de los fragmentos de ADN, siendo de un color más oscuro por el número de partículas sin degradar que aun quedan.

Conclusiones

Al final de la experiencia se obtuvo mayor inducción de daño con el uso de la CF y BL, ambas en el diseño de administración de 48 y 24 horas antes de la eutanasia. Esto constituye bajo nuestras condiciones experimentales los dos mejores diseños experimentales para inducir la formación de rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN. Aumentando considerablemente la frecuencia espontánea presente en esta especie de ratones, siendo útil en estudios de evaluación de drogas que no han sido exploradas en el ámbito de la antigenotoxicidad y genotoxicidad in vivo.

Recomendamos en un futuro realizar estudios de interferencias por si existe citotoxicidad específica en los linfocitos de los grupos tratados con ambas sustancias mutagénicas.

Bibliografía

1. Berwick M, Vineis P (2000) Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review. *J Natl Cancer Inst* 92(11):874-897.
2. Collins AR (2004) The Comet Assay for ADN Damage and Repair. *Principles Mol Biotech* 26:249-261.
3. Lee R, Steinert S (2003) Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544:43-64.
4. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B (2000) Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
5. Nadin S, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A Silver Staining Method for Single-cell Gell Assay. *The J Histochem Cytochem* 49(9):1183-1186.
6. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J (2003) Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18(2):159-166.
7. Friauff W, Hartmann A, Suter W (2001) Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis* 16(2):133-137.
8. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18(1):45-51.
9. Preston R, Dean B, Galloway S (1999) Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 189:157-165.
10. Sorsa M, Ojajärvi A, Salomaa S (1999) Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals. Teratogen, Carcinogen, and Mutagen 10:215-221.

11. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse DG, Bootman J (1990) In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity Tests. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney. 115-141.
12. Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH (1994) Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res* 312:305-312.
13. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE (1997) In vivo effects of chlorophyllin on antitumor agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 70(1):84-89.
14. Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez AJ, Davison GP, León OS (2000) Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 42:565-573.
15. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ (2001) Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 15:581-585.
16. Prieto G, Errecalde C, Trotti N (1999) Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet* 19(2):1-8.
17. Arencibia DF, Rosario LA (2010) El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 27(1):1-8.
18. Canadian Council on Animal Care (1997) Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc. 155-162.
19. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D (2009) Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel* 24(2):7-29.
20. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, López Y, Díaz D (2009) Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb/c de ambos sexos. *Retel* 23(2):8-22.
21. Díaz S, González I, González R, Coll F (2008) Evaluación antigenotóxica in vivo de un análogo de brasinosteroides. *Rev Cub Farm* 42(Sup Esp 3):75-76.
22. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E (2001) VIMANG: Los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cub Invest Biomed* 20(1):48-53.
23. Rodríguez G, Cancino L, Prieto EA, Espinosa J (2001) El Tinidazol induce roturas de simple cadena en leucocitos de ratón. *Anu Toxicol* 1(1):57-64.
24. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Natsume H, Toya M, Ito N (2007) Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mut Res* 634(2):135-145.
25. Arencibia DF, Rosario LA (2010) Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa in vivo en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Retel* 26(1):1-12.
26. Lopes L, Albano F, Laranja GA (2000) Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicol Lett* 116:189-198.
27. García O, Mandina T (2005) DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. *Mut Res* 565(2):191-197.
28. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y (2011) Daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino. *Bioteconología Aplicada* 28(2):18-29.
29. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D (2009) Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 23(3):23-40.
30. Arencibia DF, Rosario LA (2010) Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Cometa. *Ars Pharmaceutica* 51(1):49-56.
31. González JE, Gámez R, Rodeiro I, García H (2004). Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas Sprague Dawley empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo Cometa). *Revista CENIC* 35(2):125-127.
32. Rodríguez I, Valdés YC, Proveyer S (2004) Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Rev Cub Med* 43(2-3):15-19.
33. Carmignani SS, Raymund GG (1997) Safe handling of cytotoxic drugs in the physician's office: a procedure manual model. *Oncol Nurs Forum* 24(suppl 1):41-48.
34. López N, Gutiérrez M, Cortés E, Zentella A, Konigsberg M (2003). Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. *Rev Cubana Invest Biomed* 22(2):107-116.
35. Meintieres S, Nessler F, Pallardy M, Marzin D (2003) Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of the apoptosis. *Envir Mol Mut* 41:260-269.