

COMPARISON OF TWO BIOMODELS (BALB/C MICE AND SPRAGUE DAWLEY RATS) IN THE ALKALINE COMET ASSAY

COMPARACIÓN DE DOS BIOMODELOS (RATONES BALB/C Y RATAS SPRAGUE DAWLEY) EN EL ENSAYO COMETA ALCALINO

^{1,1}Daniel Francisco Arencibia Arrebola, ^{2,2}Luis Alfredo Rosario Fernández,
^{3,3}Yolanda Emilia Suárez Fernández y ^{4,4}Alexis Vidal Novoa

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

²Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

⁴Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, Cuba.

ABSTRACT

This article had as objective to carry out a comparison between Balb/c mice and Sprague Dawley rats as biomodel in the alkaline comet assay, keeping in mind the basal frequency and that induced with Cyclophosphamide, the induction of single strand breaks (SSB) or alkali-labile sites formation on DNA of peripheral blood leukocytes. Ten animal/sex/species/group of Balb/c mice and Sprague Dawley rats were used, and treated for 14 days. Using a negative control group (not treated), two substance-vehicle controls and a positive control received cyclophosphamide 50 mg/kg, via intraperitoneal. After two weeks the alkaline electrophoresis gel was performed for individual cells from leukocytes of peripheral blood to screen for possible DNA damage. The best biomodel in both sexes was the SD rats differing significantly with the results obtained in Balb/c mice keeping in mind the spontaneous and induced values of DNA damage. This study shows SD rats are a more efficient model for preclinical genotoxic evaluation of drugs, vaccines and natural products.

Key words: Comet assay, breaks, single strand, labile sites, alkali, DNA, Balb/c mice, Sprague Dawley rats.

Correspondence to author

1. darencibia@finlay.edu.cu 2. lrosario@ifal.uh.cu

3. dnsive@infomed.sld.cu 4. alexis.vidal@infomed.sld.cu

Manuscrito recibido el 28 de marzo de 2011, aceptado el 29 de abril de 2011.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo comparar ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley (SD) como modelos en el ensayo cometa alcalino, considerando la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida, de rupturas de las cadenas sencillas y formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica. Se utilizaron diez animales/sexo/especie/grupo de la línea de ratón Balb/c y de ratas SD tratados durante 14 días, utilizando un grupo control negativo (no tratado), dos controles con sustancias vehículo y un control positivo tratado con ciclofosfamida 50 mg/kg por vía intraperitoneal. Después del tratamiento se realizó la electroforesis alcalina de células individuales en gel de leucocitos de sangre periférica, para evaluar el daño en el ADN. El mejor modelo fueron las ratas SD (de ambos sexos) cuyos resultados difieren significativamente de los obtenidos en ratones Balb/c tomando en cuenta los valores espontáneos e inducidos de daño al ADN. Este estudio valida el uso de esta línea de rata para la evaluación genotóxica preclínica de drogas, vacunas y otros productos.

Palabras clave: Ensayo cometa, ruptura, cadena sencilla, sitios lábiles, álcali, ADN, ratones Balb/c, ratas Sprague Dawley.

INTRODUCCIÓN

Las rupturas de cadenas sencillas y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y sus implicaciones han sido demostradas en enfermedades degenerativas, el cáncer, y vinculadas al estrés (Nadin et al., 2001; Puchades et al., 2009). El desarrollo de la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), permitió la detección de este tipo de daño proporcionando por primera vez datos de células individuales, constituyéndose como ensayo primario en evaluaciones de fármacos, fertilizantes, plaguicidas y otros (Yiqiang et al., 2005).

El ensayo cometa consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel. Luego se someten a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el desenrollamiento de las cadenas del ADN (Collins, 2004) por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalino/neutras. A $\text{pH} > 13$ los sitios lábiles al álcali (SLA) como los sitios apurínicos son rápidamente transformados a rupturas de cadenas sencillas (Lee y Steinert, 2003), así el uso de este pH permite maximizar la expresión de los SLA a rupturas de cadenas sencillas (Tice et al., 2000). Inmediatamente después de someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, los fragmentos negativamente cargados de ADN o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo (Tripathi y Jena, 2010) para formar un halo (Collins, 2004), apreciándose una estructura parecida a un cometa (Duez et al., 2003) al teñir el ADN luego de la electroforesis.

Las células con aumento de daño a ADN muestran incremento de la migración nuclear del ADN (Tice et al., 2000; Friauff et al., 2001). Por otra parte, las células controles tienen un bajo número de rompimientos, exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño a ADN. En dichas células el ADN tiene cierta migración (Hartmann et al., 2003), encontrando un 10% de éste en la cola. Para detectar y cuantificar el daño, el ADN puede ser teñido con diferentes agentes como nitrato de plata siendo más frecuentemente usados los agentes fluorescentes. De manera que la elección depende de las necesidades específicas de cada investigador (Hartmann et al., 2003).

Poco se conoce del efecto de la ciclofosfamida (CF) como control positivo en el ensayo cometa alcalino *in vivo*, sobre todo el mutágeno reconocido en este ensayo como bleomicina. No obstante el ser la CF un mutágeno menos riesgoso justifica la evaluación en este ensayo.

La CF 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 (Te et al., 1997); pertenece al grupo cloro-etilaminas, con el desarrollo de este 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 (Prieto et al., 1999).

Pero por otro lado resulta vital en la evaluación genotoxicológica el uso de modelos experimentales eficientes, estos deben expresar la menor frecuencia de rupturas de cadenas sencillas y la formación sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica de forma endógena. Esto permitirá detectar, con el mínimo margen de error, la actividad genotóxica de un compuesto químico o agente complejo. Surgiendo como problemática el uso empírico de diferentes especies, sin conocer cuan eficientes son al detectar compuestos con bajo potencial genotóxico.

Por lo cual se decidió realizar una comparación de la frecuencia basal e inducida con CF de las rupturas de cadenas sencillas y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica entre ratones Balb/c y ratas SD de ambos sexos, mediante el ensayo cometa. Para identificar el mejor modelo experimental, lo cual pudiera aplicarse en estudios de otros fármacos o agentes no explorados en relación al efecto genotóxico.

En este estudio solo se utilizaron ratones de la línea Balb/c sobre la base de los resultados de investigaciones previas donde se concluyó que esta línea es la más eficiente en este ensayo. Tomando en consideración la baja frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea en ratones adultos (ambos sexos) de esta línea; así como la alta sensibilidad a compuestos mutagénicos como la CF (Arencibia et al., 2010a; Arencibia y Rosario, 2010; Arencibia et al., 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos

Se utilizaron ratones de la línea Balb/c de ambos sexos de ocho a nueve semanas de edad con peso promedio de 28 ± 2 g. Se emplearon ratas Sprague Dawley de ambos sexos de seis a ocho semanas con peso promedio de 195 ± 15 g. Los organismos se mantuvieron en locales individuales por especie en cajas de polietileno con tapa de reja inoxidable. Ubicados a razón de cinco animales por caja/sexo/grupo experimental. La temperatura del local fue de $23 \pm 2^\circ$ C y humedad relativa de 60 ± 10 % y fotoperiodo de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum* (CCAC, 1997).

Todos los organismos fueron alimentados con pienso esterilizado todo propósito, suministrado por el Centro de Producción de Animales de Laboratorios de la República de Cuba (CENPALAB).

Administración y dosificación

Grupos experimentales incluidos

En todos los grupos experimentales, los compuestos se administraron entre 10:30 y 11:30 y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal (Arencibia y Rosario, 2010a). Los organismos se distribuyeron aleatoriamente en lotes de 10/sexo/especie (Arencibia y Rosario, 2010a).

En el grupo experimental 1 se utilizaron organismos no tratados como control negativo. A estos animales se les practicó entubación gástrica por 14 días para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo de los otros grupos.

En el grupo experimental 2 se utilizó Tween® 65 al 2 % con solubilidad de 100g/L a 25 °C de la marca comercial APPLICHEM, como el vehículo más utilizado en preparaciones de compuestos oleosos, como agente tensoactivo (Carbajal et al., 2005; Arruzazabala et al., 2006); en el grupo experimental 3 se utilizó NaCl al 0.9 %, con un 99% de pureza como disolvente de la mayoría de los compuestos a preparar de la marca comercial BDH (BDC) (Hipler et al., 2000; Shayne, 2007). Ambos compuestos fueron preparados dos horas antes de la administración, la cual fue por vía oral en una proporción de 2 ml/kg durante un periodo de 14 días (Arencibia et al., 2011).

En el grupo experimental 4 se utilizó como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, CF=n,n-bis-(-cloruro de etilo)-n', o-esterdiamida del ácido fosfórico propinil (C17H15Cl2N2O5P), adquirida de la firma comercial Lemri, S.A bajo el nombre comercial de Ledoxina®. La CF se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0.9 % (Mitchell, 1999). La disolución fue administrada inmediatamente después de ser preparada en la proporción de 10 ml/kg 24 y 48 h antes de la eutanasia programada (Wyrobek y Bruce, 1978).

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, entre 8:30 y 10:30 y de 15:00 a 16:30. Durante cada observación se consideró el estado clínico general de los organismos, lo cual incluyó 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.

Eutanasia

Para todos los organismos se practicó la eutanasia bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de reflejos. En el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 14 días; en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, la eutanasia se realizó 24 h después de la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos.

Toma de muestra

Posterior a la pérdida total de los reflejos, se extrajo una gota de sangre de la cola equivalente a 15-20 µL. La sangre extraída de cada animal fue vertida en frascos viales con 10µL de heparina sódica, todas las muestras fueron mantenidas a 4 °C. El muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional al ADN (Speit et al., 2009) y disminuir los falsos positivos con la finalidad de que la manipulación no constituyera como un factor determinante de los resultados (Speit et al., 2009).

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (Ensayo Cometa Alcalino)

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 %.

Los nucleoides fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz, por tres observadores independientes, para establecer posteriormente un promedio entre lecturas (Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004).

Análisis visual

El análisis visual se realizó utilizando un microscopio óptico Olympus BH-2. Se analizaron 200 leucocitos/organismo, 100 leucocitos/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 (Da Costa et al., 2000; Collins, 2004). La magnitud del daño a ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) (Collins, 2004) a partir de valores posibles en un intervalo de 0-400 (García y Mandina, 2005; Smith et al., 2008).

El procedimiento para el cálculo de (UA) se resume en la siguiente ecuación:

$$UA = 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4$$

Donde:

- TCG0= Total de células, grado 0 (células no dañadas).
- TCG1= Total de células, grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN).
- TCG2= Total de células, grado 2 (daño bajo, con frecuencia baja de lesiones en el ADN).
- TCG3= Total de células, grado 3 (daño alto, con frecuencia alta de lesiones en el ADN).
- TCG4= Total de células, grado 4 (células totalmente dañadas).

Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos y especies para analizar parámetros del ensayo cometa (UA y diferentes niveles de daño) se hicieron mediante la prueba U de Mann-Whitney (Duez et al., 2003; Arencibia y Rosario, 2010a).

Se estableció *a priori* un nivel de significación $\alpha=0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el programa Statsoft para Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Cabe destacar que a lo largo de los experimentos, se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (CCAC, 1997).

RESULTADOS

Los resultados se aprecian en la Tabla 1 y en las figuras 1-4.

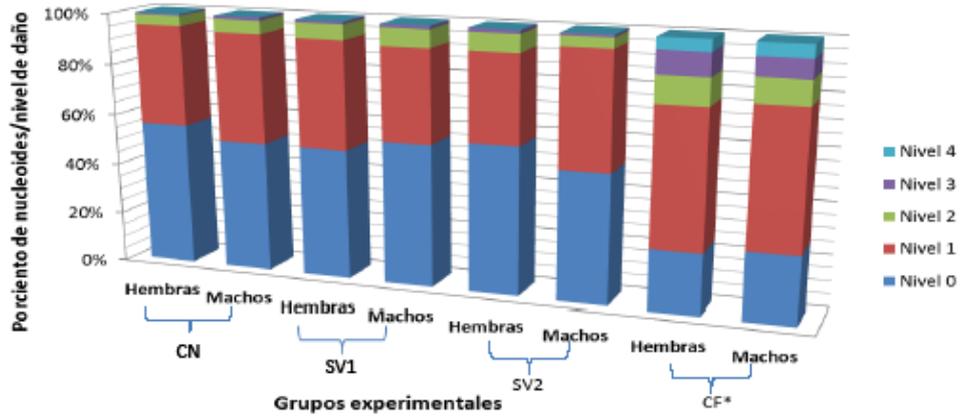


Figura 1. Porcentaje de nucleoides por nivel de daño en cada grupo experimental (ambos sexos) en ratones Balb/c. CN=Control Negativo; SV1=Sustancia Vehículo 1; SV2= Sustancia Vehículo 2; CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal

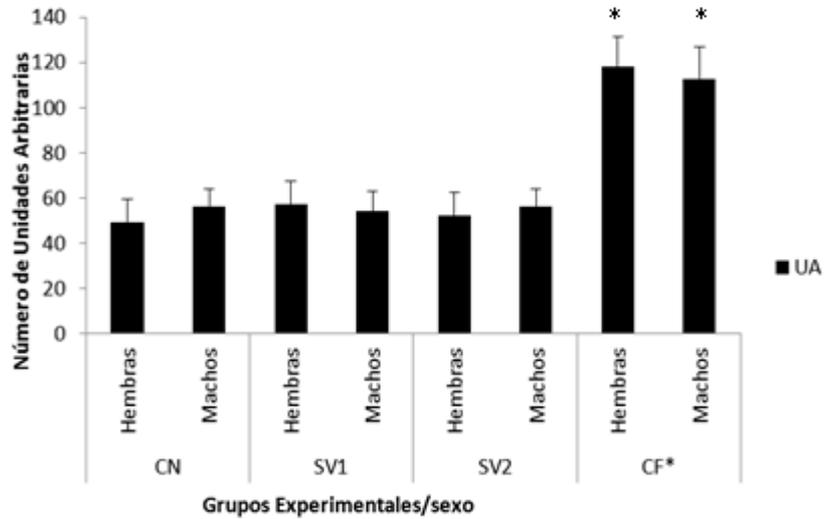


Figura 2. Unidades Arbitrarias (UA) para cada grupo experimental (ambos sexos) en ratones Balb/c. CN=Control Negativo; SV1=Sustancia Vehículo 1; SV2= Sustancia Vehículo 2; CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal. *p<0.05 (Comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney)

Tabla 1. Comparación entre ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley de ambos sexos sometidos al ensayo cometa, según inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2 (% Nucleoides)	Nivel 3	Nivel 4
Ratones Balb/c de ambos sexos							
Control	H	49.51 ± 10.24	56.00 ± 8.01	39.29 ± 7.49	4.01 ± 4.17	0.60 ± 0.68	0.10 ± 0.05
Negativo	M	56.37 ± 7.51	51.03 ± 3.14	42.72 ± 5.68	5.10 ± 2.77	1.15 ± 1.05	0.00 ± 0.00
Sustancia	H	57.23 ± 10.20	50.82 ± 9.32	42.13 ± 2.22	6.05 ± 5.28	1.00 ± 0.93	0.00 ± 0.00
Vehículo 1	M	54.25 ± 8.90	55.50 ± 9.01	36.15 ± 3.58	7.00 ± 4.66	1.30 ± 1.45	0.05 ± 0.03
Sustancia	H	52.15 ± 10.31	57.47 ± 3.76	34.27 ± 8.58	6.90 ± 4.50	1.36 ± 0.46	0.00 ± 0.00
Vehículo 2	M	56.33 ± 7.62	49.97 ± 10.03	44.92 ± 2.02	4.00 ± 5.76	1.03 ± 0.49	0.08 ± 0.02
Control	H	118.02 ± 13.28*	23.33 ± 5.22*	53.02 ± 10.64*	10.41 ± 4.99*	8.78 ± 3.90*	4.46 ± 1.43*
Positivo (CF) ¹	M	112.69 ± 14.11*	25.80 ± 3.41*	52.78 ± 11.98*	9.37 ± 1.90*	7.03 ± 2.01*	5.02 ± 0.91*
Ratas Sprague Dawley de ambos sexos							
Control	H	34.80 ± 10.24a	79.14 ± 4.32a	11.86 ± 5.02a	5.37 ± 3.10a	2.32 ± 1.01a	1.31 ± 1.00a
Negativo	M	33.46 ± 7.51a	80.10 ± 5.22a	11.23 ± 5.56a	5.00 ± 2.89	2.45 ± 1.20	1.22 ± 0.98a
Sustancia	H	32.56 ± 10.20a	80.32 ± 7.83a	11.11 ± 4.28a	5.25 ± 2.99a	2.33 ± 1.73a	0.99 ± 0.34a
Vehículo 1	M	35.03 ± 8.90a	78.21 ± 9.10a	13.19 ± 4.77a	4.98 ± 2.33a	2.60 ± 1.26	1.02 ± 0.83a
Sustancia	H	33.19 ± 10.31a	80.46 ± 6.59a	10.78 ± 5.11a	5.17 ± 3.15a	2.29 ± 1.51	1.30 ± 0.99a
Vehículo 2	M	33.44 ± 7.62a	79.75 ± 3.83a	12.19 ± 4.99a	4.96 ± 2.51	2.07 ± 1.65	1.28 ± 1.01a
Control	H	101.45 ± 13.28*a	35.56 ± 3.55*a	43.47 ± 3.44*a	10.31 ± 3.91*	6.08 ± 2.80*a	4.78 ± 2.46*
Positivo (CF) ¹	M	106.83 ± 14.11*a	32.76 ± 4.88*a	44.67 ± 4.77*a	10.56 ± 3.68*	7.00 ± 2.00*	5.01 ± 2.51*

CF (Ciclofosfamida), ¹Administración por vía i.p. *p<0.05 (Comparación contra el control negativo en la misma especie, test de U de Mann Whitney). a p<0.05 (Difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, test de U de Mann Whitney). (X media; D.E desviación estándar, para las dos series analizadas)

DISCUSIÓN

Durante los 14 días de administración no se evidenció ningún signo clínico de toxicidad. Esto fue válido para los tres grupos administrados y para los animales tratados con CF, 48 y 24 horas antes del sacrificio en las dos especies evaluadas.

Los resultados de la Tabla 1, muestran que no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y las sustancias vehículo 1 y 2 en las dos especies evaluadas al comparar las unidades arbitrarias y el porcentaje de nucleoides en cada uno de los niveles analizados (Figs. 1-4). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos. No obstante en el grupo control positivo (sometido a CF), no se observó esto. Al comparar los resultados del grupo administrado CF con el control negativo y con las sustancias solventes 1 y 2 se observaron diferencias significativas en cada una de las variables analizadas (Figs. 1-4).

El número de unidades arbitrarias inducidas por la CF constituye el doble de las que indujeron las otras sustancias utilizadas en los ratones Balb/c (Fig. 2); en las ratas SD las UA inducidas por CF constituyen el triple (Fig. 4); se observa también que el efecto fundamental de este mutágeno fue el aumento del porcentaje de nucleoides de nivel 3 y 4 (Figs. 1 y 3), niveles que experimentan mayor daño y degradación del ADN (Arencibia et al., 2010; Arencibia et al., 2010a; Moreno et al., 2010).

El hecho de no haber encontrado organismos con síntomas clínicos indicativos de toxicidad valida los resultados obtenidos en este trabajo, ya que los compuestos evaluados y las dosis utilizadas no fueron tóxicas a nivel sistémico, pero si observándose daños medibles a

nivel de ADN.

La reparación por escisión de nucleótidos es un proceso complejo que elimina al menos un segmento de 29 oligonucleótidos y que puede producir la migración del ADN lo cual es corregido luego, según el cálculo de las UA de forma experimental (Tice et al., 2000; García y Mandina, 2005; Smith et al., 2008; Doak et al., 2007).

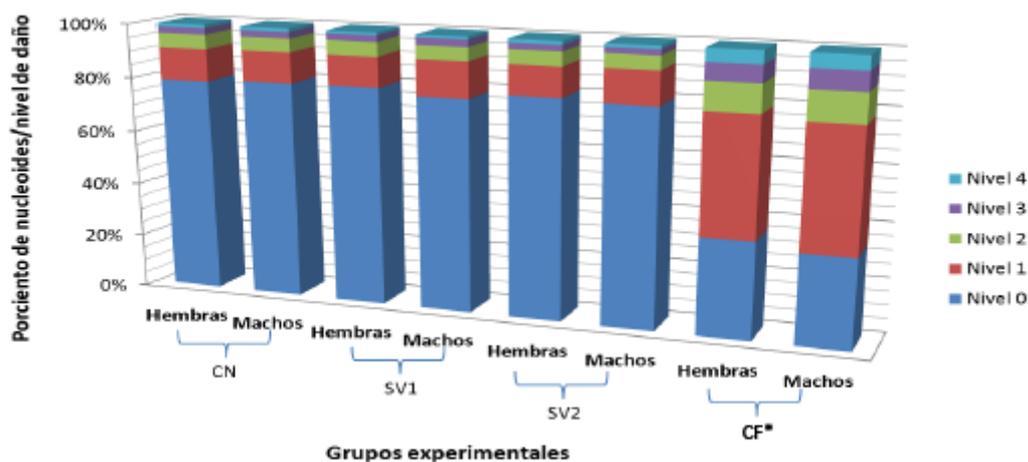


Figura 3. Porcentaje de nucleoides por nivel de daño en cada grupo experimental (ambos sexos) en ratas Sprague Dawley. CN=Control Negativo; SV1=Sustancia Vehículo 1; SV2= Sustancia Vehículo 2; CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal

Tomando en consideración en primera instancia las UA como índice de citotoxicidad y genotoxicidad corrector, se puede observar que bajo las condiciones experimentales empleadas, la línea de ratones Balb/c presentó un intervalo mayor de UA basales respecto a la línea de ratas SD (ambos sexos), resultados que difieren significativamente ($p < 0.05$).

Estos valores se encuentran en el intervalo de 49.51 y 57.23 para el caso de ratones Balb/c y entre 32.56 y 35.03 en ratas SD. Este resultado muestra la conveniencia de la utilización de ratas SD (de ambos sexos), dado que experimentan de forma endógena un mayor porcentaje de nucleoides de nivel 0 o sin daño.

Respecto a los niveles de daños 1 y 2, las ratas SD presentaron los valores más bajos (4.96 y 13.19 %) y los ratones Balb/c los valores más altos (4.00 y 44.92 %), difiriendo de forma significativa a los generados tanto de forma endógena como inducida con CF.

Los nucleoides grado 1 y 2 inducidos por CF en ratas SD registraron valores entre 10.31 y 44.67 % y entre 9.37 y 53.02 % para el caso de los ratones Balb/c.

La comparación mostró que la línea de ratas SD fue más eficiente en este ensayo que los ratones Balb/c, puesto que las ratas SD experimentaron índices menores endógenos y mayor resistencia al daño inducido por la CF bajo las condiciones experimentales empleadas, lo cual concuerda con autores como Arencibia et al., (2010), Moreno et al., (2010) y Vidal et al., (2010) quienes evaluaron ratas SD como modelo experimental en ensayos de genotoxicidad y de antigenotoxicidad.

Los resultados obtenidos son importantes para este tipo de estudios, ya que las ratas SD constituyen una línea heterogénea, por lo cual mimetizará con mayor grado los posibles efectos de una droga evaluada mediante este ensayo en el humano, lo que no fue observado en los ratones de la línea Balb/c la cual es isogénica.

Los niveles 3 y 4 también difirieron entre especies considerando los valores endógenos; al comparar los valores inducidos, los resultados mostraron un comportamiento similar. El alto porcentaje de inducción de nucleoides de los nivel es 1-4 en ratones Balb/c y ratas SD con CF como control positivo evidencia la utilidad de este clastógeno químico como inductor de daño genotóxico mediante esta técnica en las especies utilizadas.

Poco se conoce del efecto genotóxico de la CF medido por el ensayo cometa alcalino *in vivo*, ya que se reporta la bleomicina como control positivo con mayor uso. Sin embargo la CF es más barata, fácil de manipular, presenta menor riesgo para el personal, así como rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles contaminados (Tripathi y Jena, 2010). Todo lo anterior hace que la CF se pueda implementar en este ensayo de genotoxicidad como control positivo.

Los resultados basales bajos e inducidos altos en la línea de ratas SD comparados con los de ratones (línea Balb/c); permiten afirmar que esta línea de ratas es más estable genéticamente, al experimentar un menor daño endógeno en al ADN, además de ser más resistente al daño inducido por el mutágeno utilizado, lo que permite sugerir que esta línea de ratas sea empleada en este tipo de ensayo ya que se logra mayor sensibilidad y robustez a esta prueba.

Se puede concluir que el mejor biomodelo es el representado por las ratas SD difiriendo significativamente con los resultados en ratones Balb/c teniendo en cuenta los valores espontáneos e inducidos de daño a ADN. Este estudio avala el uso de esta línea de ratas en la evaluación genotóxica preclínica de drogas, vacunas y otros productos mediante el ensayo cometa alcalino *in vivo*.

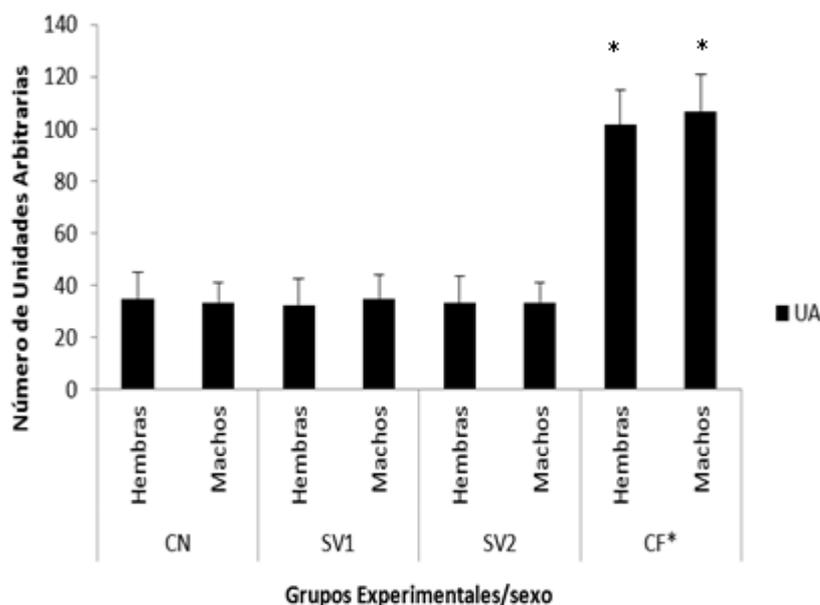


Figura 4. Unidades Arbitrarias (UA) para cada grupo experimental (ambos sexos) en ratas Sprague Dawley. CN=Control Negativo; SV1=Sustancia Vehículo 1; SV2= Sustancia Vehículo 2; CF=Ciclofosfamida, 50 mg/kg, *vía intraperitoneal. *p<0.05 (Comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney)

REFERENCIAS

- 1.- Arencibia, D.F. y L.A. Rosario, 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.
- 2.- Arencibia, D.F., A. Vidal, L.A. Rosario y Y.E. Suárez, 2010. Respuesta de ratas Sprague Dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica. Retel, 30(3): 21-35.
- 3.- Arencibia, D.F. y L.A. Rosario, 2010a. 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.
- 4.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y A. Vidal, 2010a. The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. Vacni Monitor, 19(Suplement 2): 245.
- 5.- Arencibia, D.F., L.A. Rosario y A. Vidal, 2011. The mice as ideal biomodel in the genotoxicity assays, Finlay Institute, Cuba. Revista de Salud Animal, 33(2): 55-56.
- 6.- Arruzazabala, M.L., R. Mas y V. Molina, 2006. Effects of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. Drugs Research and Development, 7: 233-241.
- 7.- Carbajal, D., V. Molina, R. Más y M.L. Arruzazabala, 2005. Therapeutic effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. Drugs Under Experimental Clinical Research, 31: 193-198.
- 8.- CCAC, 1997. Canadian Council on Animal Care Guidelines for the use of animals in Psychology. En: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Bradda Printing Services Inc. Ottawa. 162 p.
- 9.- Collins, A.R., 2004. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. Molecular. Biotechnical, 26: 249-261.
- 10.- Da Costa, L., F. Albano y G.A. Laranja, 2000. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. Toxicology Letter, 116: 189-198.
- 11.- Doak, S.H., G.J. Jenkins, G.E. Johnson, E. Quick, E.M. Parry y J.M. Parry, 2007. Mechanistic influences formulation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. Cancer Research, 15: 3904-3911.
- 12.- Duez, P., G. Dehon, A. Kumps y J. Dubois, 2003. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. Mutagenesis, 18(2): 159-166.
- 13.- Friauff, W., A. Hartmann y W. Suter, 2001. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. Mutagenesis, 16(2): 133-137.
- 14.- García, O. y T. Mandina, 2005. DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. Mutation Research, 565(2): 191-197.
- 15.- Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendle y B. Burlinson, 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis, 18(1): 45-51.
- 16.- Hipler, U., M. Gorning, B. Hipler y W. Romer, 2000. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. Archive of Andrology, 44: 147-154.
- 17.- Lee, R. y S. Steinert, 2003. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research, 544: 43-64.

- 18.- Mitchell, A.D., 1999. Product Safety Evaluation Handbook. En: Marcel Dekker (Ed.), Inc Edition Gad S.C. Genetic Toxicology Testing. U.S.A. Pp 167-168.
- 19.- Moreno, D., D.F. Arencibia y L.A. Rosario, 2010. Evaluation of Sprague Dawley rat as biomodel in two antigenotoxicity assays. *VaccniMonitor*, 19 (Suplement 2): 246.
- 20.- Nadin, S.B., L.M. Vargas y D.R. Ciocca, 2001. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *Journal Histochemical Cytochemical*, 49(9): 1183-1186.
- 21.- Prieto, G., C. Errecalde y N. Trotti, 1999. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monografía Medicina Veterinaria, 19(2): 1-8.
- 22.- Puchades, M., M.A. González, M.A. Solís, I. Torregrosa, I. García, A. Carrasco, M.C. Tormos y G. Sáez, 2009. Study of oxidative stress in advanced kidney disease. *Nefrología*, 29(5): 464-473.
- 23.- Shayne, C.G., 2007. Animal Models in toxicology. En: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group (Eds.) Toxicology, New York: (U.S.A). Pp 24-162.
- 24.- Smith, C.C., D.J. Adkins, E.A. Martin y M.R. O'Donovan, 2008. Recommendations for design of the rat Comet assay. *Mutagenesis*, 23: 233-240.
- 25.- Speit, G., M. Vasquez y A. Hartmann, 2009. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research*, 681(1): 3-12.
- 26.- Te, C., J.M. Gentile, B.C. Baguley y A.E. Pearson, 1997. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *International Journal Cancer*, 70(1): 84-89.
- 27.- Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson y A. Hartmann, 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- 28.- Tripathi, D.N. y G.B. Jena, 2010. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutation Research*, 696(1): 69-80.
- 29.- Vidal, A., D.F. Arencibia y L.A. Rosario, 2010. Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay. *Vaccni Monitor*, 19 (Suplement 2): 243.
- 30.- Wyrobek, A.J. y W.R. Bruce, 1978. Chemical Mutagens. En: United Kingdom edition published (Ed.), Principles and Methods for their detection, England. Pp 135-136.
- 31.- Yiqiang, L., Q. Mengmeng, S. Liwei, W. Yulin, C.H. Yuangao, C.H. Haigang, K. Zhiming y L. Zhengtao, 2005. Genotoxicity study of phenol and o cresol using the micronucleus test and the comet assay. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 87(3): 365-372.